

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



“CONTROL BIOLÓGICO DE PARASITISMOS GASTROINTESTINALES EN CABALLOS”

José Suárez Sánchez-Andrade

Grupo de Investigación COPAR (GI-2120)

Dpto. de Patoloxía Animal

Facultade de Veterinaria

Universidade de Santiago de Compostela

27002-Lugo



Los Doctores María Sol Arias Vázquez, Pedro Mendoza de Gives y Adolfo Paz Silva,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Control biológico de parasitismos gastrointestinales en caballos”**, que presenta el Licenciado en Veterinaria D. JOSÉ SUÁREZ SÁNCHEZ-ANDRADE para optar al Título de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo en calidad de directores, a 28 de febrero de 2017.

María Sol Arias Vázquez

Pedro Mendoza de Gives

Adolfo Paz Silva

Abreviaturas

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CPF: Caballos positivos mediante la técnica de flotación

Dcha.: Derecha

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

ESP: Productos antigénicos de excreción/secreción

FECR: Fecal Egg Count Reduction

HPG: Huevos por gramo de heces

Izda.: Izquierda

L1, L2, L3: Larva de primer estadio, segundo o tercero

OPG: Ooquistes por gramo de heces

PT: post-tratamiento

PV: peso vivo

WAAVP: World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology

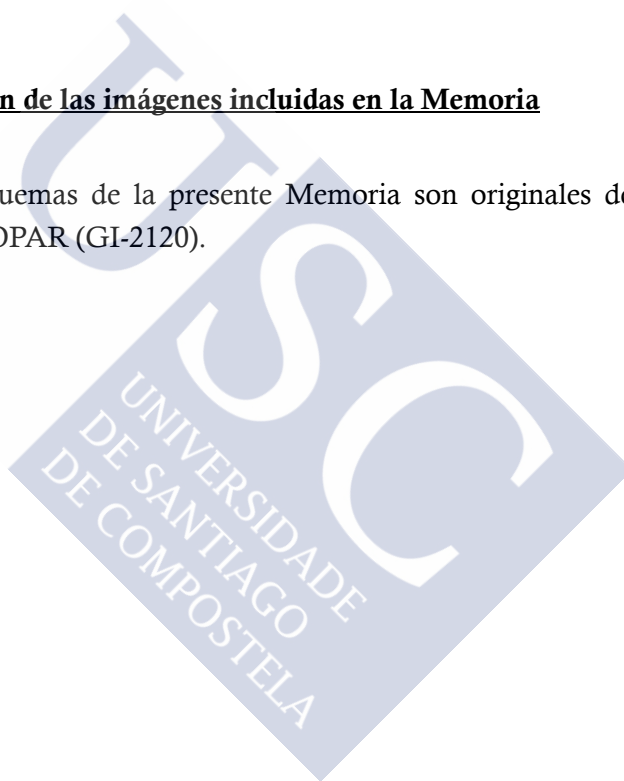


Financiación

La actividad aquí reflejada ha sido subvencionada, en parte, mediante el Proyecto de Investigación “INCORPORACIÓN DE HONGOS PARASITICIDAS AUTÓCTONOS A PIENSOS COMERCIALES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN DE ANIMALES DE RENTA” (AGL2012-34355; Ministerio de Economía y Competitividad; FEDER).

Origen de las imágenes incluidas en la Memoria

Todas las imágenes y esquemas de la presente Memoria son originales del autor y del Grupo de Investigación COPAR (GI-2120).



Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de la presente Tesis Doctoral, y en especial:

A mis directores, Dr. Adolfo Paz Silva, María Sol Arias Vázquez y Dr. Pedro Mendoza de Gives, por introducirme en el mundo de la investigación y dedicarme su tiempo. El profesor Paz Silva ha sido mi profesor de violín, en la Facultad de Veterinaria, y director de este trabajo, pero sobre todo es un amigo incondicional.

A los Catedráticos del Departamento de Patoloxía Animal, Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños, por darme la oportunidad de formar parte de este extraordinario grupo de investigación.

A los Profesores Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sánchez y Pablo Díaz Fernández por su disponibilidad y colaboración.

Al Dr. Ángel Romasanta Blanco por sus consejos y su complicidad.

A todos los profesores, compañeros y amigos que he encontrado durante estos años por medio mundo, y han convertido mi profesión en un reto continuo con el que disfruto plenamente.

A mi gran familia, en especial a mi madre, por su dedicación en todos los aspectos de la vida, sus consejos y cumplidos, sus rapapolvos y por animarme siempre a dar el siguiente paso. A mi padre, que me leyó el viaje a Ítaca, y a mi hermana, por estar ahí siempre.

A todos MUCHAS GRACIAS



Tabla de contenido

1.- ANTECEDENTES	10
1.1. PARÁSITOS DEL APARATO DIGESTIVO DE LOS CABALLOS	11
1.1.1. Desarrollo de parasitismos digestivos	12
1.1.2. Acción patógena.	17
1.2. PREVALENCIA DE HELMINTOS GASTROINTESTINALES EN CABALLOS	20
1.3. CONTROL DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN EQUINOS	22
1.3.1. Dificultades en el control de parásitos gastrointestinales en caballos	23
1.3.2. Racionalidad en el tratamiento: Terapias selectivas	27
1.4. CONTROL BIOLÓGICO DE AGENTES PATÓGENOS	29
1.4.1. Hongos parasitocidas	30
1.4.2. Hongos zigomicetos parasitocidas	34
1.4.3. Hongos ascomicetos parasitocidas	37
1.4.4. Control biológico de parásitos en caballos	40
1.4.5. Problemática del empleo de hongos como agentes de biocontrol parasitario	43
2.- OBJETIVOS	47
3.- ENSAYO I: Estimulación de la morfogénesis del hongo atrapanematodos <i>Duddingtonia flagrans</i>	49
3.1. INTRODUCCIÓN	50
3.2. MATERIAL y MÉTODOS	52
3.2.1. Obtención de clamidosporas de <i>D. flagrans</i>	52
3.2.2. Experimento I: estimulación de esporogénesis con antígenos de excreción/secreción de helmintos adultos	52
3.2.2. Experimento II: estimulación de esporogénesis con helmintos adultos	53
3.2.3. Evaluación de la formación de trampas y clamidosporas	53
3.2.4. Análisis estadístico	53
3.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN	54
3.3.1. Desarrollo del micelio de <i>D. flagrans</i>	54
3.3.2. Producción de clamidosporas de <i>D. flagrans</i>	56
4.- ENSAYO II: Alimentación de caballos con pellets elaborados de forma industrial con esporas de hongos parasitocidas	58
4.1. INTRODUCCIÓN	59
4.2. MATERIAL y MÉTODOS	60
4.2.1. Hongos parasitocidas	61
4.2.2. Producción de esporas de <i>M. circinelloides</i> y <i>D. flagrans</i>	61
4.2.2. Diseño experimental	62
4.2.3. Elaboración industrial de pellets con esporas de hongos parasitocidas	63
4.2.4. Análisis coprológicos	64
4.2.5. Análisis sanguíneos	65
4.2.6. Efectos adversos	65
4.2.7. Análisis estadístico	66
4.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN	67

4.3.1. Análisis coprológicos.....	67
4.3.2. Parámetros hemáticos.....	69
4.3.3. Efectos adversos	73
5.- ENSAYO III: Prevención de infección por strongídeos en caballos en pastoreo rotacional en una región de clima oceánico	75
5.1. INTRODUCCIÓN	76
5.2. MATERIAL y MÉTODOS	77
5.2.1. Producción de hongos saprofitos del suelo.....	78
5.2.2. Diseño experimental.....	78
5.2.3. Diseño experimental.....	79
5.2.4. Pruebas coprológicas.....	80
5.2.5. Evaluación de la eficacia antiparasitaria.....	80
5.2.6. Análisis estadísticos	81
5.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	82
5.3.1. Variaciones climáticas.....	82
5.3.2. Especies de strongídeos identificadas	83
5.3.3. Eficacia de desparasitación.....	83
5.3.4. Dinámica de eliminación fecal de huevos de strongídeos.....	85
6.- CONCLUSIONES	90
7.- RESUMEN.....	92
8.- BIBLIOGRAFÍA	98



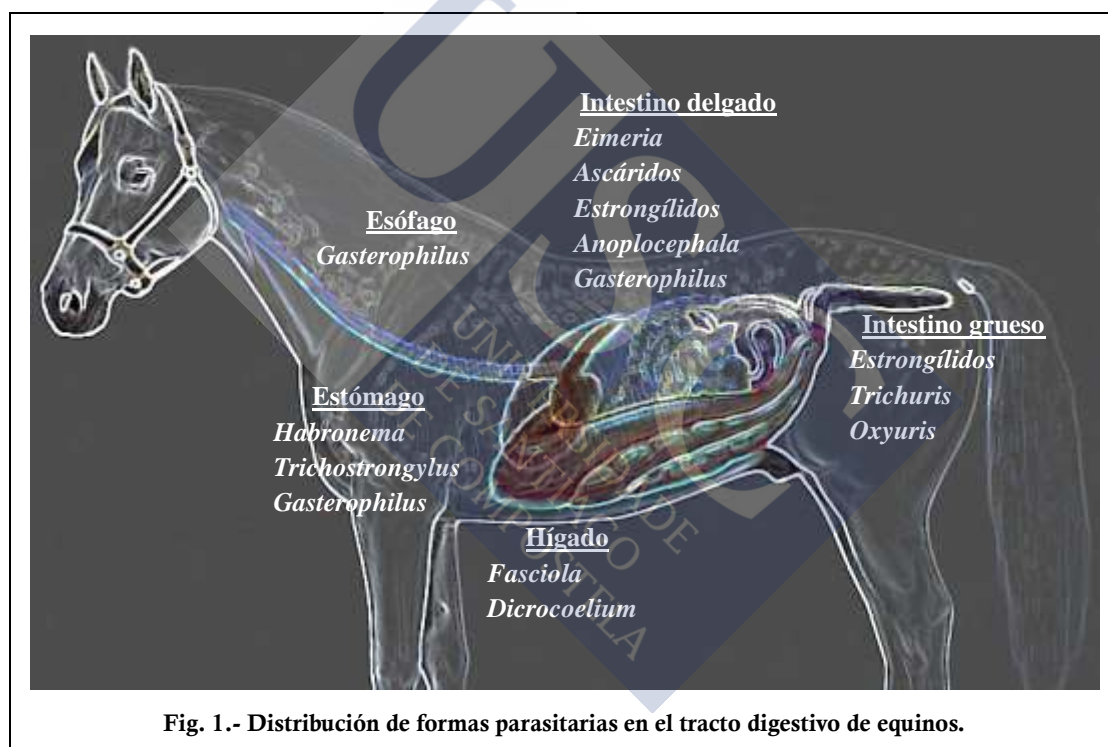


1.- ANTECEDENTES



1.1. PARÁSITOS DEL APARATO DIGESTIVO DE LOS CABALLOS

Los parasitismos gastrointestinales se encuentran entre las afecciones más frecuentes de los caballos, en especial, las causadas por nematodos estrongílicos, ascáridos y oxiúridos. Son también habituales las cestodosis provocadas por las distintas especies del género *Anoplocephala* (Francisco *et al.*, 2009a). No se suelen diagnosticar las trematodosis equinas (Arias *et al.*, 2012a; Quigley *et al.*, 2016), y por ello, en ocasiones los profesionales clínicos no dan importancia a la dicroceliosis o a la fasciolosis, que pueden llegar a alterar la función hepática, lo que repercute en otros órganos y en la salud de los caballos (Arias *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2016). Las larvas de *Gasterophilus* también se localizan en distintas zonas del aparato digestivo (estómago e intestino) de equinos (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010).



Atendiendo a su localización anatómica (Fig. 1), el intestino delgado alberga el mayor número de especies parasitarias, siendo los estrongílicos los que se encuentran más ampliamente distribuidos (a nivel mundial) y los que mayores alteraciones pueden llegar a provocar. Son también muy frecuentes las infecciones por ascáridos, oxiúridos, cestodos, y las miasis por gasterófilos.



No se dispone prácticamente de información acerca de los protozoos intestinales de equinos, centrándose la atención mayoritariamente en *Eimeria leuckarti*, especie que forma ooquistes de gran tamaño (Fig. 2).

1.1.1. Desarrollo de parasitismos digestivos

En el ciclo biológico de los parásitos del aparato digestivo se describen dos fases, exógena y endógena. Aunque en el presente estudio se hará más hincapié en la fase exógena, porque es la diana del control biológico, también se hará mención a la fase endógena para destacar la necesidad de prevenir la infección de los caballos.

a) Fase exógena



Fig. 3.- Prácticamente todos los equinos tienen acceso al pasto, lo que facilita su exposición a algunos patógenos.

La importancia de conocer la fase exógena, radica precisamente en que resulta imposible implementar cualquier programa de control antiparasitario en los caballos, sin tener en cuenta que en el medio (suelo) tiene lugar el desarrollo de las formas que van a provocar la infección de los animales, en especial cuando se alimentan en el pasto, pero también al realizar

ejercicio, pasear (Fig. 3) e incluso en el caso de no salir al campo.

En la figura 4 se resumen algunos de los parasitismos a los que pueden estar expuestos los caballos cuando se mantienen en pastoreo. En las heces de individuos parasitados se vehiculan formas de propagación (ooquistes, huevos o larvas), que en presencia de condiciones edafoclimáticas adecuadas y en algunos casos de hospedadores intermediarios apropiados,

experimentarán diferentes modificaciones hasta alcanzar la fase infectiva, que se encontrará libre en el medio o en el interior de otros organismos.



El desarrollo de los parásitos en las heces o en el suelo está condicionado por diferentes aspectos, entre los que destacan la presencia de vegetación que los protege de la desecación y de la luz directa del sol, y las condiciones climáticas (agua/humedad/, temperatura).

Los estrongídeos liberan huevos en las heces, que una vez en el medio, requieren de porcentajes de humedad superiores al 20% para que se desarrolle una L1 en el interior, que abandona el huevo y se transforma en L2, que finalmente da lugar a la L3 infectiva. Este proceso se alarga durante varias semanas si la temperatura es inferior a 10°C, entre 15-24 días a 10°C, y 3 días a 25-35°C (Mfitlodze y Hutchinson, 1987). Cuando la temperatura desciende por debajo de 6°C, los huevos de los estrongídeos no evolucionan pero mantienen su viabilidad (Smith, 2014).

En hábitats encharcados y con temperaturas por encima de 10°C, los huevos de *Fasciola hepatica* desarrollan en su interior una larva ciliada, el *miracidio*, que en medio acuoso nada hasta encontrar un caracol anfibio (del género *Lymnaea*), donde completa las fases de esporocisto, redia y cercaria, que abandona el molusco y se convierte en *metacercaria* o fase infectiva.

Cuando los huevos de *Dicrocoelium dendriticum* son ingeridos por caracoles terrestres, de ambientes xerófilos (que pertenecen a los géneros *Bulinus*, *Helix*), en su interior evolucionan hasta transformarse en cercarias, que salen al exterior con la baba del caracol y si son deglutidas por hormigas (*Formica*), forman en su interior las metacercarias.

Pese a que se suele asociar la eliminación de huevos de *Parascaris* con potros, diferentes investigaciones han demostrado que los individuos adultos también excretan huevos de ascáridos en las heces. Otra controversia ligada a la parascariosis subyace en el agente etiológico; siempre se ha considerado que *Parascaris equorum* era la especie que afectaba primordialmente a los equinos, pero recientemente se ha puesto de manifiesto que *P. univalens*, es mucho mas frecuente que *P. equorum* (Nielsen *et al.*, 2014b). En todo caso, el desarrollo de los huevos de ascáridos tiene lugar en el suelo, y se completa cuando en su interior albergan una larva de segundo estadio (L2).

Los proglotis grávidos de los cestodos salen repletos de huevos infectivos con las heces de los caballos, los huevos tienen que ser ingeridos por ácaros oribátidos para que la oncosfera se transforme en cisticercoide, fase larvaria que dará lugar al cestodo adulto (Meana *et al.*, 2005).

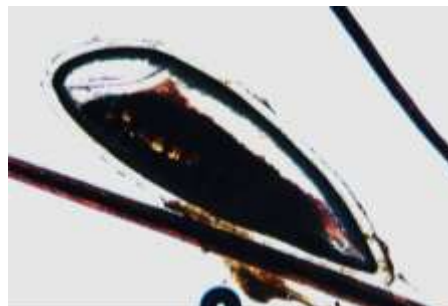
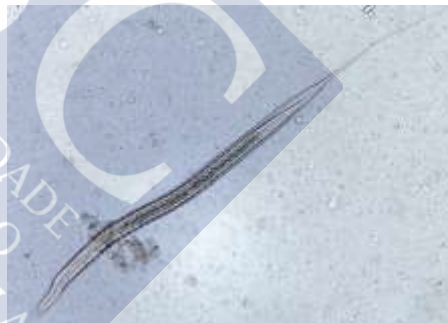
La gasterofilosis afecta sobre todo a los caballos que viven en zonas templadas y que pasan mucho tiempo en el exterior. En los días calurosos y soleados, cada mosca coloca sobre el caballo entre 300 y 2500 huevos que contienen la L1 (Duque de Araújo, 2014).

Hay que destacar que las formas infectivas de las especies mencionadas anteriormente se pueden agrupar, en función de su capacidad de movimiento, en estadios inmóviles y móviles, característica de notable relevancia para el diseño de programas de control que conlleven alguna acción sobre el medio.

b) Fase endógena

La infección de los caballos se produce por la ingestión de formas viables de las diferentes especies parasitarias, que tiene lugar en general mientras se encuentran en el exterior alimentándose del pasto, pero también cuando hacen ejercicio o pasean. En la figura 5 se exponen algunas de las más frecuentes.

Fig. 5.- Algunas de las formas infectivas de parásitos del tracto gastrointestinal de caballos.

Metacercarias de *Fasciola hepatica*.Huevo con L1 de *Gasterophilus*.Huevos de *Parascaris equorum* con larva L2.Huevo de *Trichuris* sp. con larva L1.

Larvas 3 de estrongílidos.

La mayoría son formas inmóviles, como los huevos que contienen la fase infectiva correspondiente (L1 para oxiúridos, tricúridos y gasterófilos; L2 para ascáridos). En este grupo también se encuadrarían las metacercarias de *F. hepatica*, que una vez enquistadas no tienen movilidad.

Tampoco se pueden considerar fases móviles las metacercarias de *Dicrocoelium dendriticum*, pese a que se encuentran en el interior de las hormigas que sí presentan movimiento; de forma similar ocurre la infección por *Anoplocephala* spp., cuya fase infectiva –cisticercoide- está en los ácaros oribátidos, también dotados de capacidad de movimiento (Bohórquez *et al.*, 2014).

Una vez ingeridos, los huevos y las metacercarias atraviesan el estómago y se desenquistan en el intestino delgado. Las larvas L1 de tricúridos y oxiúridos se encaminan al intestino grueso, penetrando en la mucosa y submucosa, donde van a evolucionar hasta formas adultas. En el caso de los ascáridos, las L2 desenquistadas se dirigen al hígado, desde donde migran a los pulmones, se transforman en L4, que regresan al intestino y se convierten en adultos.

El cisticercoide de *Anoplocephala* spp. se desarrolla íntegramente hasta cestodo adulto en la luz intestinal. Las fases juveniles de los trematodos se dirigen a los conductos biliares hepáticos (donde adquieren la madurez sexual), para lo cual atraviesan el peritoneo y el parénquima hepático (*F. hepatica*) o ascienden por el colédoco (*D. dendriticum*).

La infección por estrongílidos ocurre tras la ingesta de larvas 3 móviles, que se desplazan y reptan por la hierba hasta localizarse en las porciones apicales, en espera de ser ingeridas por los caballos. Las L3 de estrongílidos presentan dos ciclos intraorgánicos diferentes. Los ciatostominos (también conocidos como *pequeños estróngilos*) se introducen en la mucosa, donde se enquistan y se mantienen como L3 durante un periodo de tiempo, o se transforman en L4, que retornan al lumen intestinal y se convierten en L5 y finalmente en adultos. Las L3 de los grandes estróngilos realizan además migraciones complejas, que incluyen el páncreas (*Strongylus equinus*), arterias mesentéricas (*S. vulgaris*) o el hígado (*S. edentatus*) antes de retornar a la luz intestinal y alcanzar el estadio adulto (Francisco, 2010).

Del interior de los huevos de *Gasterophilus* spp. emergen las larvas, bien cuando los caballos los ingieren al lamerse o porque las L1 penetran activamente en la cavidad bucal (Sandin *et al.*, 2000). Se desplazan por el esófago hasta alcanzar el estómago o intestino delgado (en función de la especie), donde se transforman en L3, forma en que saldrán al exterior con las heces para transformarse en imago después de la pupación.

1.1.2. Acción patógena.

La importancia de los parasitismos, definidos como infección por agentes parasitarios, estriba en la posibilidad de que puedan llegar a provocar alteraciones en la salud de los animales, que repercutan además sobre su funcionalidad y rendimiento. Por estas razones, se hace indispensable controlar las infecciones parasitarias para que se mantengan como parasitismos y no evolucionen a parasitosis.

Las formas adultas de ascáridos, o estrongídeos desarrollan la acción patógena **a nivel intestinal**, y cuando la parasitación es intensa se asocia con enteritis, obstrucción, congestión, ulceraciones o emaciación. La presencia de muchos cestodos adultos del género *Anoplocephala* puede provocar intususcepción, perforación cecal, cólico e incluso peritonitis (Fig. 6) (Meana *et al.*, 2005).

Sin embargo, las formas inmaduras suelen resultar en general más patógenas que los adultos. Cuando las larvas de los estrongídeos penetran en el **intestino delgado** provocan hemorragias y el engrosamiento de la mucosa; el enquistamiento y su posterior salida da lugar a lesiones de tipo crateriforme, como se aprecia en la figura 7.

Las larvas de ciatostomídeos son capaces de inhibir su desarrollo penetrando en la mucosa y submucosa del intestino grueso, ciego y colon

(Bairden *et al.*, 2006), y permanecer enquistadas más de 2 años (Corning, 2009). Cuando un gran número emergen durante un corto periodo de tiempo ocasionan un síndrome conocido **ciatostomíasis larvaria** que se caracteriza por inflamación aguda de la mucosa intestinal, y cursa habitualmente con diarrea profusa y pérdida de peso (Peregrine *et al.*, 2006; Hodgkinson *et al.*, 2008; Elsener y Villeneuve 2009).

Mientras que la acción de los ciatostomídeos se limita a esta región, los larvas de los grandes estrongídeos realizan migraciones que afectan a diferentes órganos. En el caso de *Strongylus edentatus* las larvas son responsables de alteraciones a nivel pancreático, durante su migración



Fig. 6.- Los anoplocephálidos adultos pueden causar oclusión intestinal.



Fig. 7.- Mucosa con estrongídeos adultos y lesiones provocadas por estadios larvarios.



Fig. 10.- Engrosamiento de las arterias mesentéricas por L4 de *Strongylus vulgaris*.

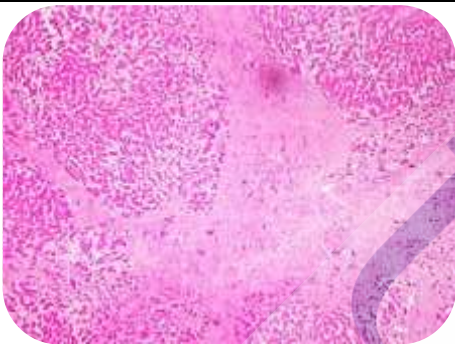


Fig. 11.- Destrucción del parénquima hepático por fasciolas juveniles.

hacia los flancos. La localización de las L4 de *S. vulgaris* en las arterias mesentéricas llega a causar alteraciones del endotelio (Fig. 10), y trombos que afectan a la circulación sanguínea. Por último, las larvas de *S. equinus*, en su desplazamiento a través del **hígado**, originan quistes y nódulos que limitan el funcionamiento de este órgano.

Junto con las posibles alteraciones provocadas por las larvas de *S. equinus*, el **hígado** también puede resultar afectado cuando las formas inmaduras del trematodo *F. hepatica* migran con gran dificultad por el parénquima para alcanzar los conductos biliares hepáticos, causando la aparición de cuadros de hepatitis monolobulillar o granulomas parasitarias (Fig. 11). En cambio, las fases juveniles de *D. dendriticum* no provocan migraciones traumáticas

porque llegan a los vías biliares directamente desde el intestino a través del colédoco. Aunque los dicrocelios no resultan tan patógenos como las fasciolas, la infección cursa con importantes alteraciones del comportamiento, apetito y condición general de los equinos, como se ha demostrado en caballos con dicroceliosis procedentes de diferentes regiones de la Península Ibérica (Suárez *et al.*, 2016).

El desplazamiento de las larvas de *Gasterophilus* spp. por la boca y el esófago hasta el estómago provoca hemorragias y ulceraciones (Fig. 8). Algunas especies de *Gasterophilus*, como *G. nasalis*, llegan al intestino delgado (Fig. 9), observándose erosiones de la mucosa entérica y en ocasiones hemorragias (Duque de Araújo, 2014).



Fig. 8.- Lesiones en la mucosa gástrica provocadas por larvas de *Gasterophilus* spp.



Fig. 9.- Larvas de *G. nasalis* en el intestino delgado.

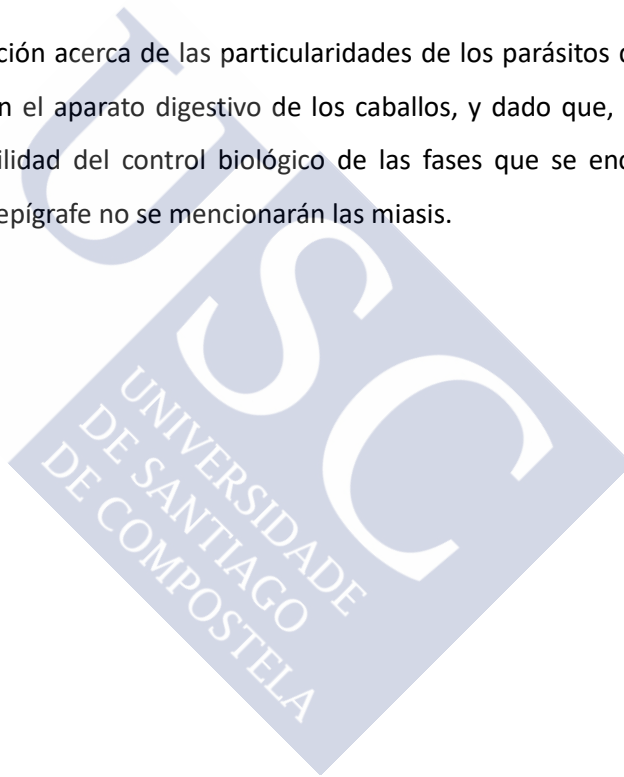
Debido a que los estadios larvarios de *Parascaris* spp. realizan una migración por el **hígado**, es frecuente la aparición de focos de necrosis en este órgano, que implican una merma en su funcionalidad; al rellenarse con tejido conectivo (también afuncional), adquieren una coloración blanquecina característica, que lleva a denominarlas *milk spots* o manchas de leche, frecuentes en



Fig. 12.- La migración de L2 de ascáridos por el hígado da lugar a *manchas blancas*.

potros (Fig. 12). Las larvas de los ascáridos continúan su migración hasta alcanzar el **aparato respiratorio**, donde originan lesiones que llevan a cuadros de disnea.

Después de la breve exposición acerca de las particularidades de los parásitos que con mayor frecuencia se encuentran en el aparato digestivo de los caballos, y dado que, en el presente trabajo se estudia la posibilidad del control biológico de las fases que se encuentran en el suelo, a partir del siguiente epígrafe no se mencionarán las miasis.



1.2. PREVALENCIA DE HELMINTOS GASTROINTESTINALES EN CABALLOS

Apenas existe información sobre la prevalencia de trematodosis equinas, indicándose que en Etiopía el 80% de los asnos eliminaban huevos de *F. hepatica* (Getachew *et al.*, 2010). Mediante ELISA y la proteína recombinante FhrAPS, se demostró que el 57% de los caballos de Galicia habían estado expuestos a este trematodo (Arias *et al.*, 2012a). En otro estudio desarrollado para estimar la seroprevalencia de dicroceliosis equina en España, Suárez *et al.* (2016) señalaron que el 45% habían desarrollado anticuerpos frente al trematodo, encontrándose las cifras más elevadas en Andalucía y las inferiores en Galicia.

En la tabla 1 se resumen las prevalencias por *Anoplocephala* spp., *Parascaris* sp. y estrongídeos en diferentes países durante los últimos 15 años.

Tabla 1.- Principales helmintos digestivos en caballos de diferentes países.			
País	<i>Anoplocephala</i> spp.	<i>Parascaris</i> sp.	Estrongídeos
PORTUGAL			
Slocombe (2006)	26%		
ESPAÑA			
Meana <i>et al.</i> (2005)	24%		
Francisco <i>et al.</i> (2009a)	1%	5%	94%
FRANCIA			
Slocombe (2006)	34%		
ITALIA			
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2009)			56%
ALEMANIA			
Epe <i>et al.</i> (2004)	1,4%	1%	37%
Slocombe (2006)	13%		
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2009)		2-16%	50%
Hinney <i>et al.</i> (2011)	14,3%	16,7%	98,4%
Relf <i>et al.</i> (2013)	4%	9%	56%
Rehbein <i>et al.</i> (2013)	28,5%	11,3%	60,8%
POLONIA			
Sokół <i>et al.</i> (2005)	2,2%	1,1%	64,3%

País	<i>Anoplocephala</i> spp.	<i>Parascaris</i> sp.	Estrongídeos
GRAN BRETAÑA			
Coles y Rhodes (2005)			24%
Rehbein <i>et al.</i> (2007)		24%	100%
von Samson-Himmelskjær <i>et al.</i> (2009)			61%
Comer <i>et al.</i> (2006)	16%		
Morgan <i>et al.</i> (2005)	52%		
UCRANIA			
Slivinska (2006)			100%
Kuzmina <i>et al.</i> (2006)			100%
TURQUÍA			
Gürler <i>et al.</i> (2010)	3,3	12	100%
CANADÁ			
Slocombe (2006)	52%		
ESTADOS UNIDOS			
Martin-Downum <i>et al.</i> (2001)		5%	76%
Lyons <i>et al.</i> (2006a)		10-46%	
Lyons <i>et al.</i> (2006b)	100%	24%	76%
MÉXICO			
Valdéz-Cruz <i>et al.</i> (2013)			90%
BRASIL			
Pereira y Vianna (2006)			100%
Teixeira <i>et al.</i> (2014)	8%	20%	100%
NUEVA ZELANDA			
Slocombe (2006)	26%		
NIGERIA			
Ehizibolo <i>et al.</i> (2012)		12%	12%
ETIOPIA			
Fikru <i>et al.</i> (2005)		17%	93%
Getachew <i>et al.</i> (2010)*	8%	51%	99%
Seyoum <i>et al.</i> (2015)		21,4%	73,4%
(*: asnos)			

1.3. CONTROL DE PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN EQUINOS

En revisiones previas se ha señalado que el principal mecanismo para el control de parásitos gastrointestinales consiste en la administración de fármacos (Francisco, 2009; Sánchez, 2012; Francisco, 2013). A pesar de que se dispone de principios activos que resultan muy eficaces, la presencia de formas infectivas en el suelo favorece la reinfección de los caballos, de modo que con la desparasitación convencional se consigue un efecto poco duradero. Para paliar esta situación, en algunos países se aconseja repetir la desparasitación cada 3-4 meses, procedimiento que podría estimular el desarrollo de cepas de parásitos *resistentes* (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007).

En la tabla 2 se indican los antiparasitarios más empleados en los caballos y su principal espectro de acción (Sánchez, 2012). Nótese que en ningún momento se considera el tratamiento del trematodo *F. hepatica*, para lo que estaría indicado el triclabendazol, ni el de *D. dendriticum*, cuyo fármaco de elección sería el netobimin; este último, es un pro-bencimidazol eficaz frente a ambos trematodos hepáticos, y podría ser el tratamiento de elección siempre que la historia clínica induzca a sospechar de estos agentes etiológicos (Suárez *et al.*, 2016).

Tabla 2.- Existen numerosas formulaciones para el control de parásitos gastrointestinales.			
Molécula	Parásito	Molécula	Parásito
Fenbendazol	Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos	Ivermectina	Cestodos (con PZQ) Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos
Febantel	Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos	Moxidectina	Cestodos (con PZQ) Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos
Mebendazol	Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos	Praziquantel	Cestodos
Oxibendazol	Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos	Piperazina	Ascáridos
Tiabendazol	Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos	Pamoato de pirantel	Cestodos Estrongílicos Ascáridos Oxiúridos

En la actualidad, la única vía de administración de antiparasitarios que se usa es la *vía oral*, y los productos que se encuentran en el mercado están en forma de *pasta* (Fig. 13). A pesar de que se han desarrollado algunos ensayos que han probado la eficacia de la aplicación tópica (*pour on*) de la ivermectina, ningún laboratorio farmacéutico ha considerado interesante comercializar esta presentación, que facilitaría mucho la desparasitación de los caballos, en especial de aquellos que son difíciles de manejar y que necesitan una correcta inmovilización (Francisco *et al.*, 2009a, b; 2011; 2012).



Fig. 13.- La formulación de antiparasitarios en pasta oral se emplea con frecuencia para la desparasitación de caballos.

1.3.1. Dificultades en el control de parásitos gastrointestinales en caballos

a) Eficacia disminuida - Resistencia

Como se recoge en la Tabla 2, el importante número de fármacos antiparasitarios facilita el diseño de programas de control en caballos. Sin embargo, desde hace algunas décadas se vienen señalando reducciones en la eficacia de algunos parasiticidas, que alcanzan en ocasiones valores que llevan a sospechar del desarrollo de *resistencia antiparasitaria* en algunas cepas (Tabla 3).

Tabla 3.- Eficacia del tratamiento antiparasitario en caballos.				
Ensayo	Principio activo	Cestodos	Ascáridos	Estrongílidos
		FECR	FECR	FECR
Steinbach <i>et al.</i> (2006)	Fenbendazol			100%
Cleale <i>et al.</i> (2006)	Moxidectina		>90%	>90%
Osterman Lind <i>et al.</i> (2007)	Fenbendazol			86%
	Ivermectina			>99%
	Pirantel			99%
Schougaard y Nielsen (2007)	Ivermectina		70%	99%
	Pirantel		97%	99%
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2007)	Ivermectina		>95%	
Slocombe <i>et al.</i> (2007)	Fenbendazol		100%	
	Ivermectina		33'5%	
	Moxidectina		47'2%	
	Pirantel		>97%	
Kuzmina y Kharchenko (2008)	Albendazol			69%

Ensayo	Principio activo	Cestodos	Ascáridos	Estrongídeos
		FECR	FECR	FECR
Lindgren <i>et al.</i> (2008)	Fenbendazol Ivermectina Pirantel		100% 100% 100%	
Lyons <i>et al.</i> (2008)	Fenbendazol Oxibendazol Ivermectina Pirantel			0% 0% 100% 12%
Francisco <i>et al.</i> (2009b)	Ivermectina	100%	100%	100%
Veronesi <i>et al.</i> (2009)	Ivermectina Pirantel		71-73% 100%	
Francisco (2010)	Fenbendazol Pirantel Ivermectina Moxidectina Doramectina		100% 100%	94% 100% 96% 89%
Cutolo <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina			99%
Rossano <i>et al.</i> (2010)	Ivermectina Fenbendazol			100% 100%
Larsen <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina		97%	100%
Näreaho <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina Pirantel		52%	79% 43%
Francisco <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina Moxidectina			100% 100%
Sokól <i>et al.</i> (2015)	Ivermectina			100%

Se conoce como *resistencia antiparasitaria* la capacidad heredable de sobrevivir a la acción de fármacos parasiticidas. La característica primordial de esta definición radica en la transmisión de la perdurabilidad de una generación a otra, que la dota de una base genética (Kwa *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta que la prueba más empleada para evaluar la eficacia de tratamientos antiparasitarios es la Reducción Fecal del Recuento de Huevos (en inglés *Fecal Egg Count Reduction Test*, FECRT), se han establecido parámetros para establecer posibles resistencias. Por ello, se toma como referencia que la Asociación Mundial para el Desarrollo de la Parasitología Veterinaria (*World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology*, WAAVP) señala que para los caballos existe resistencia frente a bencimidazoles si la eficacia es <90% (Kaplan, 2004), aunque este criterio no es unánimemente aceptado, e incluso se ha llegado a clasificar el resultado del tratamiento en *eficaz* si el resultado del FECRT supera el 90%, *dudoso* si se encuentra entre el 80 y el 90%, e *ineficaz (resistencia)* si desciende del 80%.

La resistencia antiparasitaria tiene un carácter preadaptativo, de modo que los genes implicados se encuentran en la población parasitaria aunque a bajas frecuencias, que se incrementan cuando lo hace la presión de selección, por ejemplo con tratamientos inadecuados. Se han señalado varios aspectos relacionados con la aparición de resistencia antiparasitaria, principalmente la aplicación repetida de un mismo fármaco o de principios activos de la misma familia, junto con la administración de dosis subterapéuticas (Jackson y Coop, 2000; Nielsen *et al.*, 2010).

En la convicción de que es inevitable que surjan poblaciones parasitarias resistentes por la existencia de individuos portadores de genes que la codifican, se propusieron algunas prácticas para reducir su aparición, sobre todo la limitación de la frecuencia de tratamiento, y el mantenimiento de la población *refugia* (Nielsen *et al.*, 2007). Por **refugia** se entienden aquellos estadios parasitarios que no han estado expuestos a la acción de fármacos antiparasitarios, y por ello no han estado sometidos a presión de selección de resistencia (Coles, 2002). Las larvas de parásitos que se encuentran en el medio (suelo, hierba) son el componente principal, al que hay que añadir aquellos organismos alojados en hospedadores que nunca han recibido tratamiento, así como los parásitos que se encuentran en localizaciones que los mantienen a refugio de la acción de antiparasitarios, como larvas inhibidas o enquistadas (Dobson *et al.*, 2001; van Wyk, 2001; Rojo-Vázquez y Meana, 2008).

b) Estadios parasitarios diana - Periodo de reaparición de huevos en heces

Con objeto de profundizar en el efecto de los antiparasitarios, inicialmente referido a la infección por *estrongídeos*, se consideró adecuado valorar el periodo de reaparición de huevos en heces (*Egg Reappearance Period*, ERP). Este parámetro aporta una información muy útil para aclarar qué fases de los parásitos son la diana de los tratamientos. Si el ERP es superior al periodo de prepatencia, se trata de un fármaco activo frente a formas juveniles y adultas, mientras que un ERP inferior puede indicar eficacia limitada frente a los estadios inmaduros, que completarán su desarrollo hasta convertirse en adultos, que eliminarán huevos en las heces.

En los últimos años, se ha añadido una nueva interpretación para el ERP en infecciones por *estrongídeos*, asociándose la disminución de este periodo (<5 semanas post-tratamiento con ivermectina) a resistencia antiparasitaria (Tabla 4) (Lyons *et al.*, 2008; Molento *et al.*, 2008).

Tabla 4.- Valores para el periodo de reaparición de huevos de nematodos en heces de caballos después de recibir tratamiento antiparasitario.

Ensayo	Principio activo	ERP (semanas)	
		Ascáridos	Estrongílidoss
Mercier <i>et al.</i> (2001)	IVM + PZQ Moxidectina		8
			9
Chandler y Love (2002)	Moxidectina		17
Osterman Lind <i>et al.</i> (2007)	Fenbendazol		-
	Ivermectina		5
	Pirantel		8
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2008)	Ivermectina		8
von Samson-Himmelstjerna <i>et al.</i> (2012)	Ivermectina Pirantel		
Lyons <i>et al.</i> (2008)	Fenbendazol		8
	Ivermectina		
	Oxbendazol		
	Pirantel		
Francisco <i>et al.</i> (2009b)	Ivermectina		8
Francisco (2010)	Fenbendazol		5
	Pirantel		
	Ivermectina		5
	Moxidectina		
Larsen <i>et al.</i> (2011)	Doramectina		5
	Ivermectina		4
Francisco <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina		6
	Moxidectina		6
Näreaho <i>et al.</i> (2011)	Ivermectina		

c) Fases de vida libre – estadios infectivos

Como ya se ha indicado con anterioridad, los estadios infectivos en el suelo constituyen un riesgo para la infección y reinfección de los caballos, en especial para los que se mantienen habitualmente en el pasto. En estos casos, la administración de terapia antiparasitaria constituye una solución temporal al problema porque si los equinos se mantienen en hábitats contaminados, necesitarán nuevas administraciones de antiparasitarios con frecuencias altas (3-4 meses) (Hertzberg *et al.*, 2014), práctica que como se ha mencionado previamente favorece la selección de resistencia antiparasitaria.

No parece desatinado tratar de relacionar la contaminación de los pastos por formas parasitarias (carga parasitaria en los prados) con el ERP, asumiéndose que periodos largos (>9 semanas post-tratamiento con ivermectina) aportarían no solo información acerca de la eficacia del producto sobre formas inmaduras, sino que también señalarían escasa presencia de parásitos en el medio. Por el contrario, si el ERP adquiere valores reducidos, se podría achacar a un limitado efecto sobre los estadios juveniles, así como a mayor contaminación del pasto por formas parasitarias.

1.3.2. Racionalidad en el tratamiento: Terapias selectivas

A pesar de la disponibilidad de fármacos eficaces, existen algunos aspectos relacionados con la desparasitación de los caballos que podrían reducir la eficacia esperada, entre estos cabe destacar la ausencia de análisis periódicos para comprobar si existe infección parasitaria antes o después del tratamiento, la desparasitación solo de individuos de elevado valor económico, o el tratamiento únicamente cuando se aprecia visualmente pérdida de la condición corporal (Francisco *et al.*, 2011).

La detección de problemas asociados al tratamiento de caballos ha servido para plantear un uso *racional* de los productos antiparasitarios, que permita mantener la eficacia de estos fármacos sin aumentar la presión selectiva de parásitos resistentes. En esta línea, al principio se insistió en establecer las épocas más adecuadas para la aplicación de tratamientos, concluyéndose que eran aquellas que entrañaban un mayor riesgo, es decir, primavera y otoño (Nielsen *et al.*, 2007).

Con el tiempo, el concepto de *terapia selectiva* ha evolucionado tratando de mantener la racionalidad del tratamiento en base al establecimiento de criterios objetivos que faciliten la adopción de decisiones al respecto, y por tanto bajo esta acepción respondería a la cuestión de cuándo es necesario tratar a los caballos. No resulta sencillo adoptar razones unánimes que sean aceptadas en todo el mundo, por lo que esta idea no se aplica con frecuencia (Francisco *et al.*, 2012). En general, la terapia selectiva se basa en el establecimiento de un valor de *punto de corte*, que una vez superado señala la necesidad de administrar tratamiento antiparasitario. Esencialmente, se asienta este valor en los recuentos fecales de huevos de strongílidos, estableciéndose en 100-300 HPG (Elsener y Villeneuve, 2009; Nielsen *et al.*, 2010; Francisco *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2014).

La explicación a la variabilidad del punto de corte estriba en la ausencia de avenencia para establecer a partir de qué cifras de eliminación de huevos existen problemas de salud en los equinos, o lo que es lo mismo, la dificultad de diferenciar parasitismo de parasitosis. También es importante tener en cuenta la posible existencia de diferencias en la susceptibilidad considerando la raza de los animales, o el historial de tratamientos aplicados. Resulta curioso comprobar cómo en los países del Norte de Europa (Dinamarca, Noruega, Finlandia, Suecia) se asignan valores de 300 HPG para considerar el tratamiento de los caballos con antiparasitarios,

porque se relacionan con un detrimento de su salud (Nielsen *et al.*, 2010), mientras que en el Sur (España, Portugal) se pueden alcanzar eliminaciones superiores a 500-1000 HPG sin observarse signos clínicos (Madeira de Carvalho, 2006; Madeira de Carvalho *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2009a, b).

Una posible explicación a esta aparente disparidad podría encontrarse en las grandes diferencias que han existido hasta hace algunos años, y que aun perduran, en las frecuencia de desparasitación de los caballos. Sánchez (2012) apuntó que la terapia selectiva aporta una solución muy práctica para frenar el desarrollo de resistencia antiparasitaria, pero que no debe caer en el olvido que la infección de los caballos se produce por la ingestión de larvas infectivas (L3), por lo que únicamente la administración de tratamientos sobre los hospedadores (caballos) no es suficiente para el control de las infecciones parasitarias, y sería recomendable desarrollar a tal fin alguna estrategia en el medio.



1.4. CONTROL BIOLÓGICO DE AGENTES PATÓGENOS

La creciente preocupación por la sostenibilidad del medio, junto con la probada necesidad de limitar la frecuencia de tratamientos antiparasitarios para preservar su efecto, ha impulsado la búsqueda de procedimientos complementarios que contribuyan a solucionar este problema. Cada vez es mayor la concienciación entre cuidadores, propietarios y profesionales veterinarios, de la importancia que tiene la contaminación del pasto por formas parasitarias, que provocan la infección reiterada de los caballos. En este punto es interesante destacar que pese a que hay caballos que se mantienen en boxes, salvo para ejercitarlos, es muy raro que no tengan acceso al pasto durante esos momentos (Cazapal-Monteiro *et al.*, 2014). También conviene aclarar que cuando se menciona el control biológico de parásitos, no se refiere a la supresión de los tratamientos convencionales, sino de su empleo razonado, como ya se ha referido previamente.

Las primeras referencias al control biológico aluden a épocas muy antiguas, antes de Jesucristo, y hacen mención a campesinos chinos que empleaban unas hormigas determinadas para el control de las orugas dañinas para los cítricos (Badii y Abreu, 2006). En la era industrial se descubrieron diferentes microorganismos que podrían resultar útiles como agentes de control biológico. Así, en el año 1889 se empleó por primera vez un escarabajo para el control de una escama que amenazaba la industria citrícola (Badii y Abreu, 2006).

Se entiende por **Control Biológico** o **Biocontrol** *el fenómeno de regulación del número de plantas y animales por medio de enemigos naturales (parásitos, predadores y patógenos)* (Zerba, 2003). El Control Biológico Aplicado generalmente se implementa de tres formas diferentes o combinaciones de las mismas:

Conservativo: Consiste en alterar las prácticas de cultivo de manera que favorezcan el desarrollo de los agentes de control biológico natural y sus efectos.

Aumentativo: Los agentes de control biológico se producen en forma masiva en el laboratorio y se aplican en forma inoculativa o inundativa para destruir las plagas.

Clásico: Es la fase de aplicación compuesta por el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales exóticos.

El control biológico está libre de los efectos secundarios asociados a productos de amplio espectro, y cuando es aplicado por especialistas, bajo principios establecidos, resulta seguro y no tiene efectos adversos sobre el ecosistema.

1.4.1. Hongos parasitoides

Desde hace algunas décadas se viene indicando la capacidad que tienen algunos hongos del suelo para desarrollar actividad frente a algunos estadios parasitarios. Se trata de organismos heterótrofos, que se alimentan mediante la absorción de nutrientes cuya digestión tiene lugar en el medio en el que se desenvuelven (suelo, agua, alimentos...). Hasta la fecha, los hongos con actividad parasitoides son los Eumycota, también conocidos como *hongos verdaderos*, se caracterizan por tener la pared celular compuesta por quitina y glucanos. Se ha intentado explicar la capacidad de transformación reversible que tienen estos hongos para pasar de saprotróficos a zootróficos, estableciéndose que la morfogénesis se estimula en presencia de excretas de nematodos en el medio y de niveles bajos de C y N, y se inhibe en medios enriquecidos de C y N (Anan'ko y Teplyakova, 2011). Aunque las clasificaciones de los hongos se revisan con cierta frecuencia, se han descrito seis filos:

- Chytridiomycota
- Zygomycota
- Ascomycota
- Basidiomycota
- Microsporidia
- Glomeromycota

Como se resume en la tabla 6, los hongos empleados en control biológico son zigomicetos y ascomicetos.

Tabla 6.- Principales hongos del suelo con actividad parasitoides.

Especie	Género	Familia	Orden	Clase	Phylum	Efecto
<i>Duddingtonia flagrans</i>	<i>Duddingtonia</i>	Orbiliaceae	Orbiliales	Orbiliomycetes	Ascomycota	Larvicida
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	<i>Arthrobotrys</i>	Orbiliaceae	Orbiliales	Orbiliomycetes	Ascomycota	Larvicida
<i>Monacrosporium thaumasium</i>	<i>Monacrosporium</i>	Orbiliaceae	Helotiales	Leotiomycetes	Ascomycota	Larvicida
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>Pochonia</i>	Clavicipitaceae	Hypocreales	Sordariomycetes	Ascomycota	Ovicida
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor</i>	Mucoraceae	Mucorales	Zygomycetes	Zygomycota	Ovicida
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Paecilomyces</i>	Thermoascaceae	Eurotiales	Euromycetes	Ascomycota	Ovicida
<i>Verticillium</i> spp.	<i>Verticillium</i>	Plectosphaerellaceae	Incerta	Sordariomycetes	Ascomycota	Ovicida
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma</i>	Hypocreaceae	Hypocreales	Sordariomycetes	Ascomycota	Ovicida

a) *Zigomicetos*

Morfológicamente se caracterizan por una pared celular compuesta de quitina, quitosano y ácido poligalacturónico, y un micelio cenocítico (sin tabiques). Se encuentran con frecuencia en el pan, la fruta y vegetales, algunos parasitan plantas, insectos y pequeños animales, y otros forman relaciones simbióticas con plantas. Los zigomicetos se localizan normalmente en hábitats terrestres, viviendo en el suelo, plantas o animales. La mayoría de las especies son saprofitas y se alimentan de materia orgánica en descomposición. Cuando el hongo se encuentra en estado vegetativo, los núcleos son haploides y en general se reproducen asexualmente mediante esporas (esporangiosporas), que en un sustrato adecuado germinan y dan lugar a nuevo micelio.

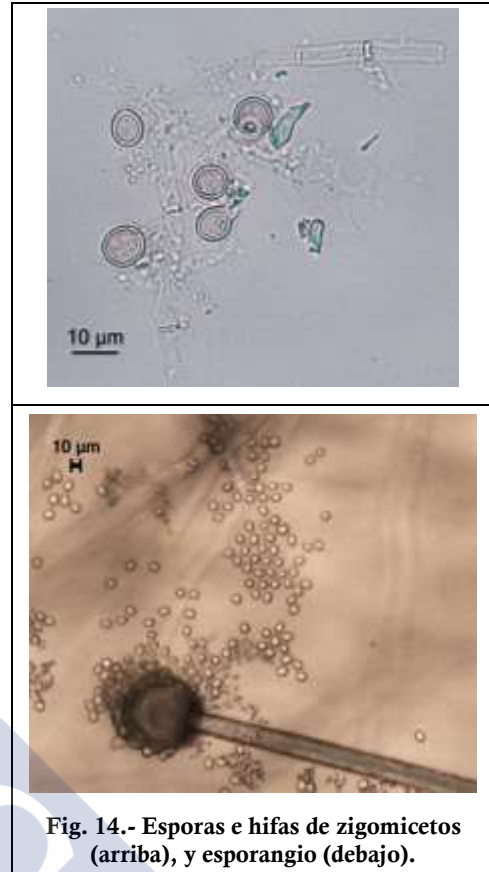


Fig. 14.- Esporas e hifas de zigomicetos (arriba), y esporangio (debajo).

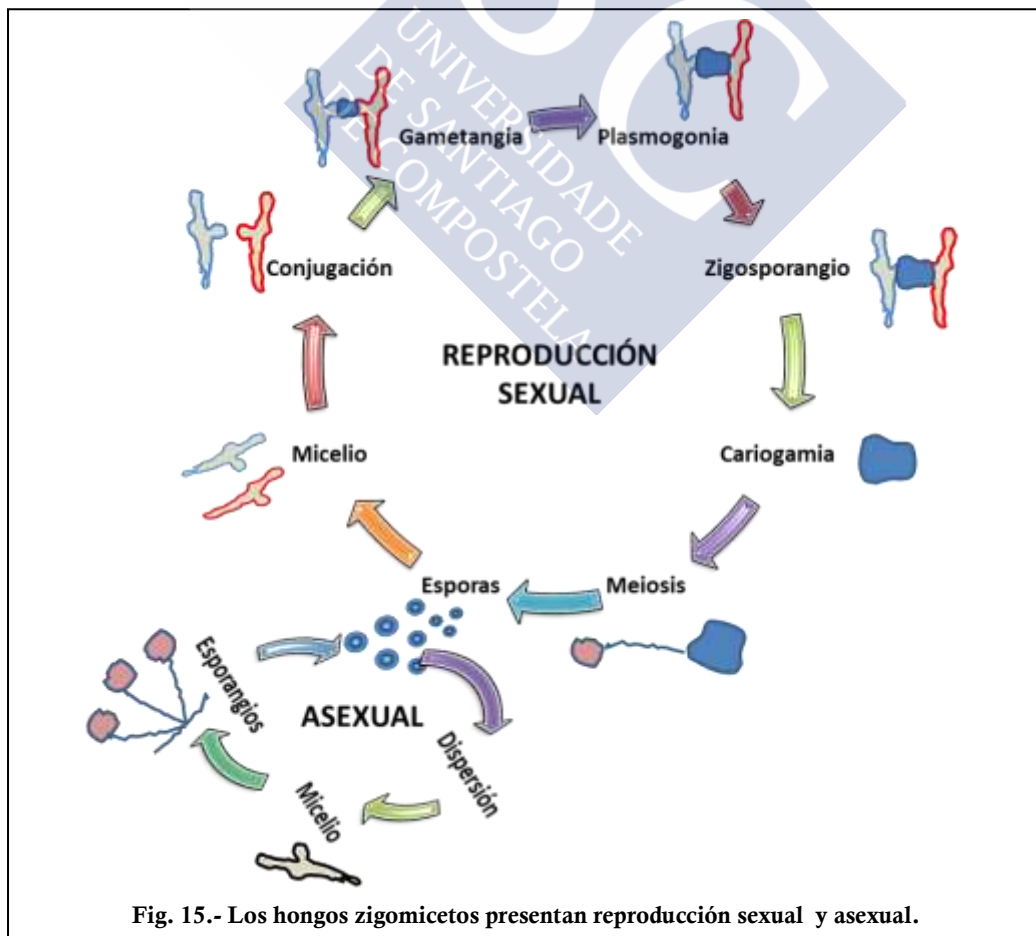


Fig. 15.- Los hongos zigomicetos presentan reproducción sexual y asexual.

La reproducción sexual transcurre bajo condiciones desfavorables. Dos cepas denominadas *opuestas* se aproximan para que sus gametos se acoplen (gametangio), originándose hifas que se unen hasta que los núcleos se fusionan (cariogamia) (Figs. 15-16). Las zigosporas diploides (esporas sexuales) que se desarrollan tienen cubiertas gruesas que las protegen de la desecación, y permanecen en estado de



Fig. 16.- La reproducción sexual de los zigomicetos da lugar a zigosporangios.

latencia hasta que las condiciones del medio son favorables. Cuando las zigosporas germinan, ocurre una meiosis que da lugar a esporas haploides, que a su vez crecen en un nuevo organismo. Esta forma de reproducción sexual se denomina *conjugación*, y da lugar a los *hongos conjugados*.

b) Ascomicetos

Existen en torno a unas 40.000 especies, en diferentes hábitats, que se reproducen sexual o asexualmente. Muchos ascomicetos tienen importancia comercial debido a su participación en los procesos de elaboración del pan, la cerveza y en la fermentación del vino (Rangaswami y Bagyaraj, 2005). Los ascomicetos filamentosos producen hifas divididas por septos que permiten el flujo de citoplasma de una célula a otra (Fig. 17). Los conidios y los ascos que emplean para reproducirse de forma asexual y sexual, respectivamente, se encuentran separadas de las hifas vegetativas por septos bloqueados (no perforados).



Fig. 17.- Los ascomicetos presentan hifas septadas.

Se conocen como *hongos saco* debido a que la reproducción sexual da lugar a esporas que se forman en un saco llamado *asco*, que contiene ocho ascosporas producidas por una división celular meiótica seguida por una mitosis (Fig. 18). La reproducción sexual se inicia con el desarrollo de hifas especiales de ambos tipos de cepas de acoplamiento. La cepa *macho* produce un anteridio y la *hembra* un ascogonio. Durante la fertilización, ambos se combinan en la plasmogonia sin fusión nuclear, y surgen hifas ascógenas en las que migran pares de núcleos: uno del macho y otro de la hembra. En cada asco, 2 ó más ascosporas fusionan sus

núcleos en cariogamia. Los núcleos diploides dan lugar a núcleos haploides. Durante la reproducción sexual, miles de ascos llenan un cuerpo llamado ascocarpo. El núcleo diploide origina núcleos haploides por meiosis. Las ascosporas se liberan, germinan y forman hifas que se diseminan en el medio y empieza un nuevo micelio.

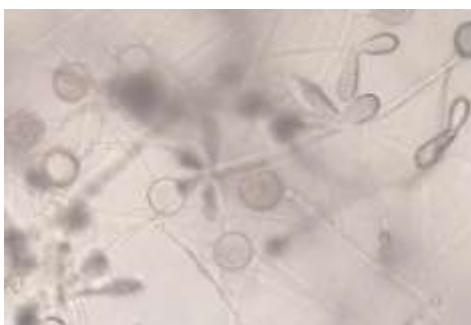
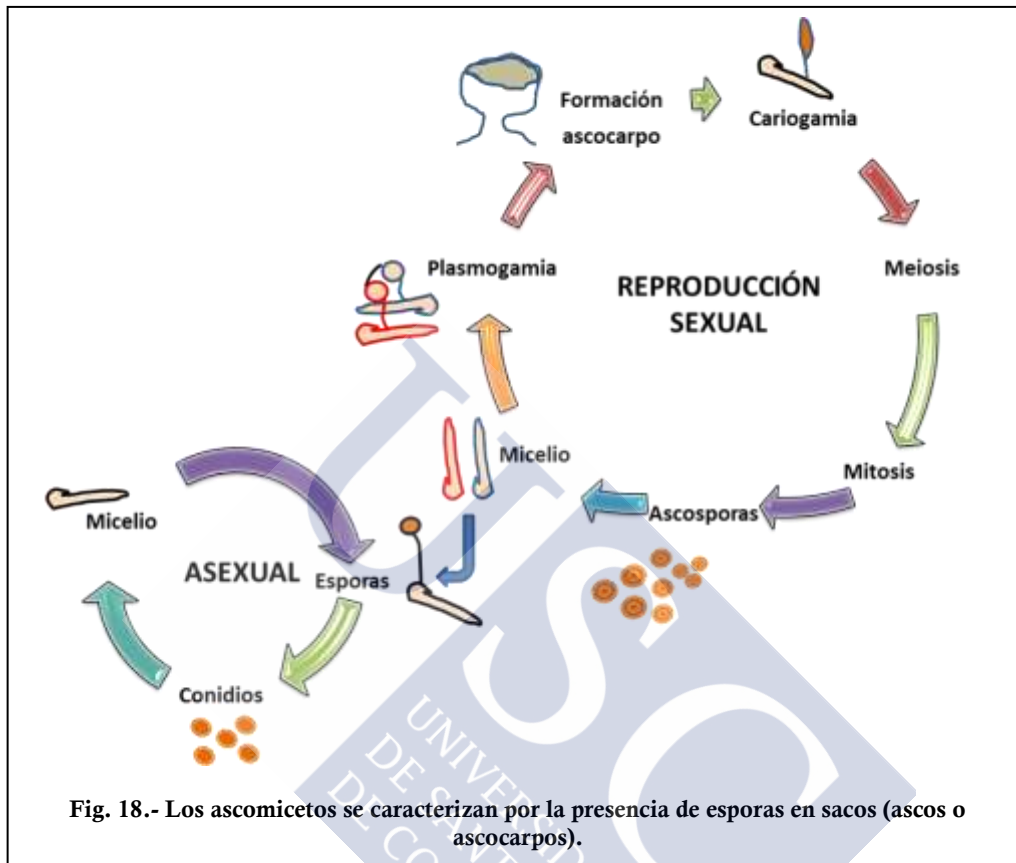
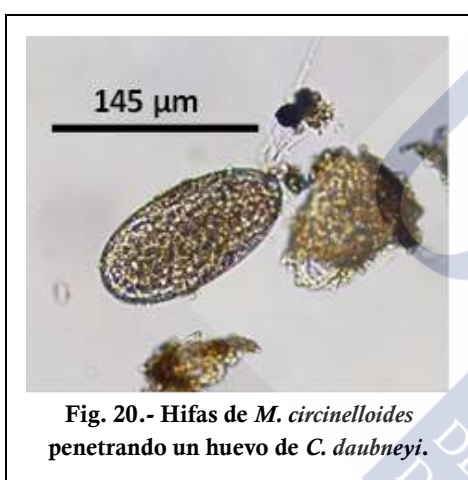


Fig. 19.- Conidios y clamidosporas son originados frecuentemente mediante reproducción asexual.

Los principales modos de reproducción asexual son los brotes, fisión de hifas, o formación de formación de oidios, conidios o clamidosporas (que son haploides).

1.4.2. Hongos zigomicetos parasitoidas

El género *Mucor* es el único que hasta la fecha ha demostrado actividad parasitoida sobre huevos de helmintos, aunque no en todas las especies. Ciarmela *et al.* (2002) comprobaron que *M. hiemalis* no afectaba a los huevos de *Toxocara canis*; en un trabajo posterior, estos autores tampoco observaron actividad de *M. minutus* sobre los huevos de estos ascáridos (Ciarmela *et al.*, 2012). Por el contrario, ensayos realizados por el Grupo de Investigación COPAR (GI-2120; USC) con la cepa CECT20824 de *M. circinelloides* demostraron una notable actividad antagonista frente a huevos helmintos (Hernández, 2014; Paz-Silva *et al.*, 2016).



Arroyo *et al.* (2017) realizaron ensayos en los que analizaron la actividad antagonista de *M. circinelloides* sobre huevos del trematodo gástrico *Calicophoron daubneyi* que se mantenían en tubos eppendorf en medio acuoso, y destacaron que su viabilidad disminuía significativamente después de 28 días. Estos resultados confirmaron los datos obtenidos previamente sobre los huevos de *F. hepatica*, en los que se determinó una reducción de la viabilidad del 66% en placas, y del 58% en heces (Cortiñas *et al.*, 2015).



En un estudio desarrollado con huevos de *T. canis*, Arias *et al.* (2013) indicaron que tras 30 días de exposición a *M. circinelloides*, la viabilidad disminuía en un 57% (Fig. 21). Hernández (2014) llevó a cabo tres ensayos similares, que corroboraron los datos anteriores. Posteriormente, se obtuvieron resultados parecidos sobre huevos de *Baylisascaris procyonis* en heces de mapaches (*Procyon lottor*), en los que la exposición a esporas de *M. circinelloides* durante 28

días provocó la reducción de la viabilidad en un 55%, comprobándose además que si se añadía arena a las heces, para simular un entorno parecido al de parques, areneros, etc., la actividad antagonista aumentaba al 72% (Cazapal-Monteiro *et al.*, 2015).

También se ha evaluado el efecto de este zigomiceto sobre los huevos de *Trichuris* sp. aislados de heces de dromedarios mantenidos en el Parque Zoológico “Marcelle Natureza” (Begonte, Lugo) (Paz-Silva *et al.*, 2016); a los 15 días de ponerlos en contacto con esporas de *M. circinelloides* en placas Petri, se comprobó que existía rotura de la cubierta, con penetración y posterior destrucción del embrión interior, por lo que de acuerdo a Lýsek *et al.* (1982) se concluyó que este hongo desarrollaba actividad ovicida de tipo III (Tabla 7).

Tabla 7.- Actividad antagonista de hongos sobre huevos de parásitos (Lýsek <i>et al.</i> , 1982).	
Actividad	Efecto
Ninguna	0
Adherencia de hifas a la superficie	I
Adherencia y penetración	II
Adherencia, penetración y destrucción del embrión	III

Mecanismo de acción

Tomando como base las investigaciones desarrolladas por Lýsek y Stěrba (1991) acerca del efecto antagonista del hongo ascomiceto *Verticillium chlamydosporium* (actualmente *Pochonia chlamydosporia*) sobre huevos de *Ascaris lumbricoides*, Cazapal-Monteiro (2015) y Cortiñas (2015) definieron cuatro etapas en la interacción de *M. circinelloides* con huevos de helmintos, como se puede observar en la figura 22.

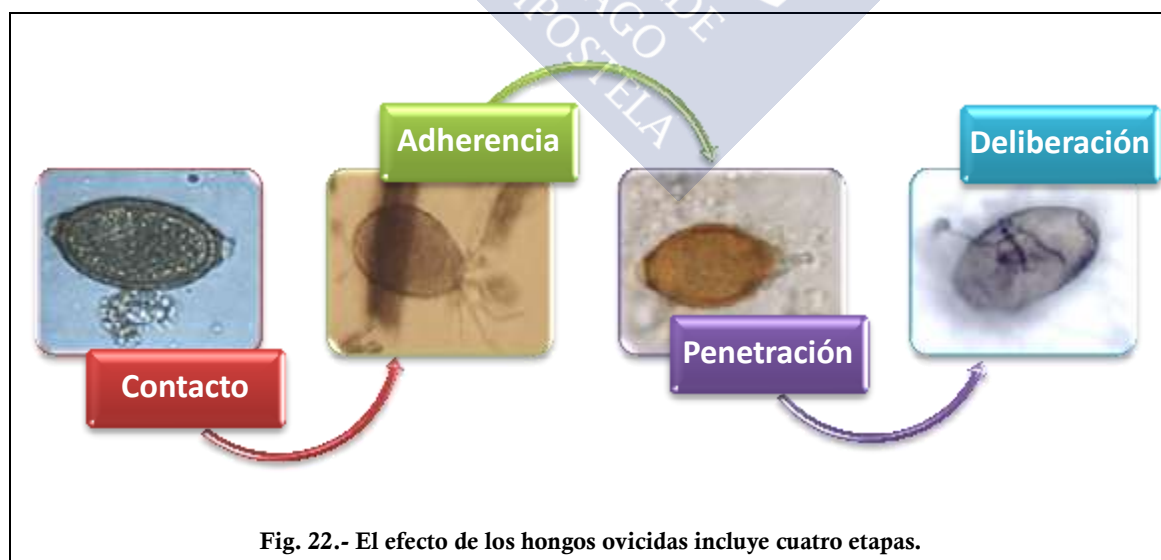
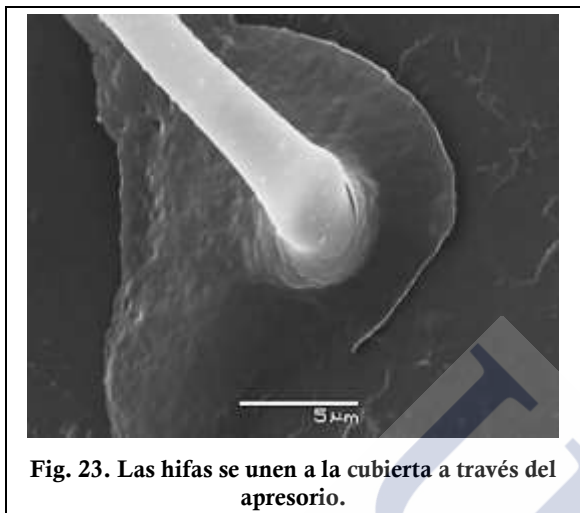


Fig. 22.- El efecto de los hongos ovicidas incluye cuatro etapas.

No se han aclarado todavía los mecanismos mediante los cuales los hongos detectan huevos en su inmediación, aunque es posible que participen estímulos químicos presentes en su cubierta,

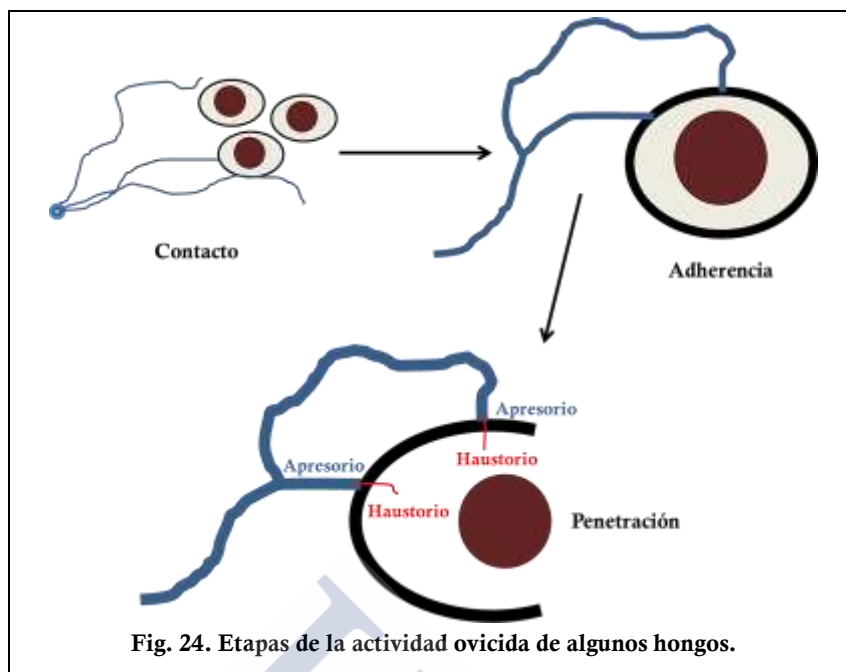
que activan el desarrollo de hifas a partir de esporas que se encuentran en el suelo, o también de otras hifas (**fase de contacto**), que van tejiendo una malla alrededor de las formas parasitarias (Irving y Kerry, 1986).



A continuación, las hifas se unen a la cubierta de los huevos (**fase de adherencia**), en un mecanismo facilitado por el desarrollo en el extremo apical de una estructura que se denomina *appresorium* o apresorio, que en realidad es una proyección del micelio que ejerce la función de órgano de fijación (Fig. 23). Para que tenga lugar esta unión, las hifas han de colocarse en perpendicular a la cubierta (Brunori *et al.*, 1985).

Pese al desconocimiento de los elementos implicados en esta fase de penetración, se considera que participan fenómenos físicos, que empujan la cubierta hasta que se produce su rotura, a la que contribuye la liberación de diferentes enzimas proteolíticas (López-Llorca *et al.*, 2010). También parece bastante plausible que una hifa sola no sea capaz de romper la cubierta de quitina, y se precisarían varias que provocarían pequeñas invaginaciones en la superficie de los huevos (Jatala, 1986), que se acompañan de otras estructuras originadas en el interior del apresorio, el *haustorium* o haustorio, cuya finalidad es absorber nutrientes del interior del huevo (Dunn, 1983). Todo este procedimiento estaría apoyado en la liberación de enzimas proteasas y quitinasas, como se ha demostrado con ascomicetos como *Pochonia chlamydosporia* y *Purpureocillium lilacinum* (Lýsek y Krajčí, 1987; Esteves *et al.*, 2009; López-Llorca *et al.*, 2010; Larriba *et al.*, 2012).

Estos mecanismos de penetración aseguran que la cubierta se mantengan intactas, y de este modo no se pierda su contenido interno (Fig. 24). En la última etapa se produce la ingestión de los nutrientes del interior del huevo, y las hifas finalmente salen en busca de otros huevos que colonizar (**fase de deliberación**) (Lýsek y Štěřba, 1991).



Debido a que en gran parte de los ensayos realizados con hongos ovicidas se han empleado huevos sin embrionar, a veces incluso obtenidos directamente del útero tras la disección de nematodos hembra, parece razonable plantearse si existen diferencias en función del estadio de desarrollo que presenten los huevos. Ensayos previos señalaron una mayor actividad antagonista sobre los estadios más precoces (Jatala, 1986; Kerry, 1987), resultados que no concuerdan con otros posteriores en los que se demostró que *Verticillium* y *Mucor* son eficaces con independencia del desarrollo embrionario de los huevos (Irving y Kerry, 1986; Lýsek y Štěřba, 1991; Blaszkowska *et al.*, 2014; Flament, 2015).

1.4.3. Hongos ascomicetos parasitoides

Es el grupo más numeroso de hongos, y engloba especies con actividad ovicida o larvicida.

a) Ascomicetos ovicidas

Además de nutrirse a partir de materia orgánica en descomposición del suelo, pueden hacerlo a partir de huevos de trematodos, cestodos o nematodos, debido a su capacidad de desarrollar mecanismos para penetrar y asimilar el contenido interno (Braga *et al.*, 2011; Cazapal-Monteiro *et al.*, 2014), fenómeno que tiene lugar como se ha explicado previamente para los zigomicetos.

La especie más estudiada en los últimos años es *Pochonia chlamydosporia* (previamente *Verticillium chlamydosporium*), antagonista de huevos y también de nematodos hembra (Lýsek y Stěrba, 1991). Se ha demostrado su eficacia frente a huevos de cestodos (Araujo *et al.*, 2009), trematodos (Dias *et al.*, 2013; Lelis *et al.*, 2014), ascáridos (Lýsek y Stěrba, 1991; Braga *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2012; De Carvalho *et al.*, 2014), oxiúridos (Braga *et al.*, 2010) y tricúridos (Silva *et al.*, 2010b).

Paecilomyces penetrans y *Purpureocillium lilacinum* (anteriormente *Paecilomyces lilacinus*) son algunos de los agentes más empleados para el control biológico de nematodos que infectan plantas (Rahoo *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012), y también tienen actividad sobre huevos de *T. canis* (Carvalho *et al.*, 2010; Gortari *et al.*, 2008). El efecto antagonista se desarrolla mediante la penetración directa de las hifas, ayudadas por la acción de serín-proteasas liberadas durante el proceso (Zareen *et al.*, 2001). El preparado Bio-Nematon® (T. Stanes & Company Ltd., India) incluye esporas de *P. lilacinum* y se comercializa como agente biológico para el control de nematodos en especies vegetales.

Trichoderma harzianum es otra especie ascomiceto con actividad ovicida, gracias a la capacidad de sus hifas para penetrar la cubierta de los huevos (en colaboración con diferentes enzimas secretadas), y de liberar metabolitos tóxicos en el interior de los huevos (Haran *et al.*, 1996). Algunos estudios previos indicaron la ausencia de esta actividad sobre huevos del ascárido *T. canis* (Ciarmela *et al.*, 2002).

b) Ascomicetos larvicidas

Este grupo de ascomicetos tiene la capacidad de asegurar sus requerimientos de carbono, energía y nitrógeno a partir de larvas de nematodos (Barron, 1977). En este caso la morfogénesis se induce tras una **fase de reconocimiento** en la cual las hifas desarrolladas a partir conidios, esporas, etc. reconocen en la cutícula de larvas vivas y en movimiento (originadas de huevos excretados en las heces) unos compuestos que inicialmente recibieron el nombre de *nemina*, y que posteriormente se han relacionado con la lectina (Monoson *et al.*, 1974; Grønvold *et al.*, 1996; Boguś *et al.*, 2005). Feder *et al.* (1960) demostraron que un único ejemplar muerto del nematodo *Panagrellus redivivus*) promueve la formación de gran cantidad de trampas por *Dactylella doedyoides*, lo que también sucede con el medio obtenido tras la incubación de distintas especies de *Dactylella* con 100.000 nematodos (Feder *et al.*, 1963).

La etapa de reconocimiento se traduce en la rápida multiplicación de las hifas, en las que además se van intercalando unas estructuras cuya finalidad es la captura de los estadios larvarios, de ahí la denominación de *hongos atrapanematodos* (Liu *et al.*, 2012) (Fig. 25).

Se han descrito varios procedimientos, anillos constrictores y no constrictores, redes adhesivas, como columnas adhesivas, extremos (dedos) adhesivos con y sin tallo, esferas espinosas, estefanoquistes y acantocitos (Barron, 1977; Stirling, 1991; Yu *et al.*, 2014).

Cuando las larvas de nematodos strongílidos se desplazan por el suelo desde las heces hacia especies vegetales, para ser ingeridas por animales en pastoreo, ocurre la **fase de adherencia**, y las larvas resultarán inmovilizadas (Fig. 25). Una vez que se ha conseguido la paralización completa, se forman *hifas invasivas*, responsables de la **fase de penetración** de la cutícula, proceso en el que también participan enzimas o metabolitos extracelulares secretadas por el hongo, y que facilitan la colonización posterior de la larva (Yang *et al.*, 2014). Por último, las *hifas asimilativas* desarrollan la **fase de asimilación** de los nutrientes del interior de vaina y larva (Cortiñas, 2016).

Duddingtonia flagrans es el hongo atrapanematodos más estudiado hasta el momento. Se trata de una especie que

elabora anillos no constrictores recubiertos de una sustancia adhesiva, caracterizada por la producción de varios conidios en los extremos de los conidióforos (Fig. 25), rasgo que lo diferencia de otras especies nematófagas como *Monacrosporium* spp. (Rubner, 1996). La elevada producción de clamidosporas intercaladas con hifas vegetativas, junto con la capacidad para sobrevivir al paso por el tracto digestivo, lo convierte en una especie de elección en experiencias de control biológico parasitario (Scholler *et al.*, 1999). Las clamidosporas cuentan con paredes gruesas y morfología variada (25-50 μm x 10-15 μm), en función del medio de cultivo en el que se obtienen (Fig. 26).

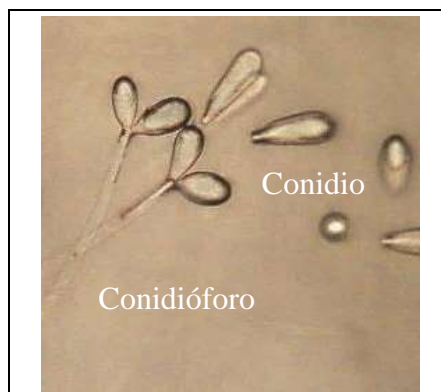
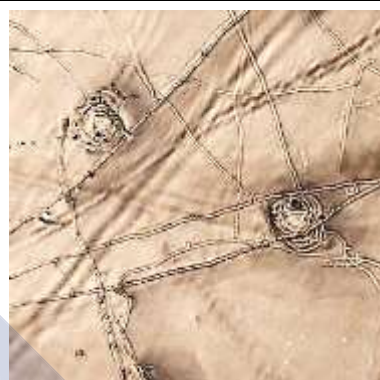
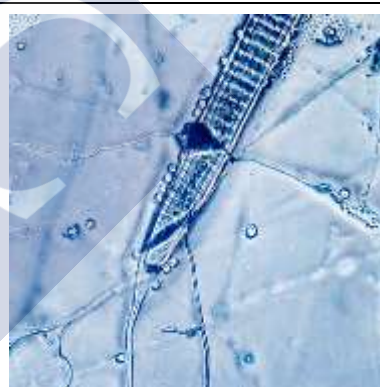


Fig. 25.- Los conidios de *D. flagrans* se forman por reproducción asexual.



En condiciones favorables dan lugar a hifas, en las que se intercalan trampas



que atrapan las larvas L3, que son retenidas y finalmente destruidas.



Fig. 26.- La morfología de las clamidosporas de *D. flagrans* muestra diferencias en función del medio. (Izda.: Placa con agar-trigo; Centro: Medio líquido COPFr; Dcha.: Heces de equino).

La eficacia de *D. flagrans* se ha demostrado tanto frente a nematodos que afectan a animales de renta como a mascotas (Araujo *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010; Paz-Silva *et al.*, 2011; Mendoza de Gives y Torres-Acosta, 2012).

1.4.4. Control biológico de parásitos en caballos

En las dos últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios para tratar de disminuir el riesgo de infección parasitaria en caballos, teniendo en cuenta los problemas que han surgido en diferentes países acerca de eficacias de antiparasitarios inferiores a las esperadas, que llegan a convertirse en situaciones de resistencia antiparasitaria.

Pese a que sería aconsejable aplicar estrategias para el control integrado, basadas en medidas sobre los caballos y sobre el medio, en realidad no existen muchas posibilidades para limitar el riesgo de infección de los equinos. Se ha señalado la conveniencia de distintas medidas de manejo de pastos, como siegas frecuentes, rotación de diferentes especies animales, o retirada de las heces de forma mecánica (Lloyd, 2009). También que resultaría beneficioso resembrar los terrenos con cierta frecuencia (Baudena *et al.*, 2000), o dejar que la hierba crezca y ensilarla (Soulsby, 2007).

En ocasiones se menciona el más que probable efecto beneficioso de mantener a los caballos en un régimen de pastoreo rotacional, que además de asegurar la correcta nutrición, evite que se mantengan en entornos altamente contaminados por formas infectivas como las larvas de tercer estadio de estrongídeos (L3).

a) Ensayos con hongos parasitoides

La mayoría de los ensayos en caballos se han orientado al control de nematodos estrongídeos, y por ello se han empleado especies larvicidas. Los primeros estudios se realizaron en Dinamarca, y consistieron en la incorporación de clamidosporas a muestras de heces de caballos parasitados por ciatostominos (Bird y Herd, 1995). Se emplearon tres dosis de 1, 10 y 100 esporas de *A. oligospora* y *D. flagrans* por huevo por gramo de heces, y después de 8 días, con 1 espora los porcentajes de reducción de L3 resultaron de 40,5% y 32,1% para *A. oligospora* y *D. flagrans*, con 10 esporas fueron de 87,4% y 90,5%, y con 100 de 95,8% y 93,9%.

El análisis del efecto de la adición directa de tres dosis de clamidosporas de *D. flagrans* (0,1, 0,2, 0,4 y $0,8 \times 10^6/100$ g heces) sobre las heces de caballos Pura Raza Galega que eliminaban huevos de ciatostominos, reveló que el porcentaje de reducción de L3 oscilaba entre el 91 y el 97% (Paz-Silva *et al.*, 2011), concluyéndose que este efecto era dénsito-dependiente.

En un ensayo *in vitro* en placas Petri con *D. flagrans* se demostró una reducción del 93,64% de L3 de ciatostominos de caballos (Braga *et al.*, 2009a). Más adelante, al añadir L3 de *Strongyloides westeri* a las placas Petri previamente sembradas con *D. flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* y *A. robusta*, se consiguió disminuir los recuentos de L3 en un 80,4%, 79% y 72,8%, respectivamente (Araujo *et al.*, 2010). Al repetir el ensayo con las heces de asnos que recibieron por vía oral esporas de *D. flagrans* y *M. thaumasium*, se obtuvieron unos porcentajes de reducción de las larvas de *S. westeri* del 62,7-85,3% y 76,7- 92,2%, respectivamente (Araujo *et al.*, 2012).

Después de elaborar en el laboratorio pellets de alginato sódico con micelio de *D. flagrans* y *M. thaumasium*, y proporcionarlos a caballos, Tavela *et al.* (2013) recogieron las heces y las colocaron en placas Petri, a las que añadieron a continuación 1000 L3. Los resultados mostraron una reducción superior al 80% en los recuentos larvarios.

Larsen *et al.* (1995) demostraron que las clamidosporas de *D. flagrans* eran capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo de los caballos, y salir en las heces, sin perder la capacidad de desarrollar el micelio. A continuación, Wolstrup *et al.* (1996) comprobaron que *D. flagrans* presentaba mejores porcentajes de supervivencia en las heces de caballos que *A. oligospora*, señalando la idoneidad de la primera para desarrollar experimentos en los que las esporas se añadían al alimento, para asegurar su presencia en las heces.

Una vez demostrada la utilidad de *D. flagrans*, se llevaron a cabo algunas pruebas de campo, basadas en la administración de clamidosporas en premezcla alimentaria fabricada de manera artesanal (Larsen *et al.*, 1996). De este modo, se consiguió reducir la presencia de L3 en el suelo, y el riesgo de reinfección para los caballos. Fernández *et al.* (1999) desarrollaron una prueba que consistió en la administración de 10^6 clamidosporas de *D. flagrans*/Kg pv a un grupo de caballos, y observaron que al mantener las heces en el laboratorio la reducción de las L3 en los coprocultivos era del 98,4%. Cuando las heces se mantenían en un prado para que soportaran las condiciones naturales, la infectividad se redujo en 85,8-99,4%. A partir de este momento, en todos los ensayos con caballos se procedió a dosificar las esporas en función del peso vivo de los caballos, al igual que si se tratase de fármacos antiparasitarios. Más recientemente, Buzatti *et al.* (2015) ensayaron tres dosis de $1,5 \times 10^5$, 3×10^5 y 6×10^5 clamidosporas de *D. flagrans*/ Kg pv, y observaron que se reducía de forma significativa el recuento de L3 de ciatostominos a partir de las 72 horas de la ingestión de las esporas.

Son escasos los estudios en condiciones de campo, ante la ausencia de información acerca de la utilidad de *D. flagrans* en áreas de climas cálidos, Baudena *et al.* (2000) mezclaron las heces de un caballo desparasitado y alimentado con una dosis de 2×10^6 clamidosporas de *D. flagrans*/Kg pv, con las heces de caballos parasitados por ciatostominos, y las depositaron en un prado. De este modo demostraron que la presencia de *D. flagrans* disminuía los recuentos de L3 en un 66-99%.

En vista de los excelentes resultados obtenidos mediante la administración oral de clamidosporas de *D. flagrans*, se consideró la posibilidad de facilitar este procedimiento a los propietarios/cuidadores de los caballos. En esta línea, Braga *et al.* (2009b) prepararon en el laboratorio pellets de alginato sódico con micelio del hongo larvicida, y administraron 1 g / 10 Kg pv una vez a la semana a un grupo de caballos, durante seis meses. Mediante análisis coprológicos comprobaron una reducción significativa en los recuentos fecales de huevos de ciatostominos, así como de L3 en muestras de hierba. Este efecto beneficioso se corroboró con un incremento en la ganancia de peso de los equinos, de modo que los autores concluyeron que la preparación de pellets con micelio de *D. flagrans* constituía una herramienta muy útil para reducir la presencia de ciatostominos en áreas tropicales como el sureste de Brasil. En un ensayo posterior conducido en la misma región, Araújo *et al.* (2010) señalaron de nuevo que *D. flagrans* y *M. thaumasium* sobrevivían al tracto digestivo sin experimentar cambios en su capacidad predadora de L3 de *Strongyloides westeri*. Sin embargo, en otro estudio desarrollado en el sur de Brasil se lograron unos resultados un poco diferentes, puesto que a pesar de que

mediante la administración oral de una dosis de 1×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* a un grupo de potros se consiguió disminuir la presencia de larvas L3 en el suelo, esto no se reflejó en los valores fecales de eliminación de huevos de ciatostominos, y no se obtuvieron diferencias en relación con el grupo testigo (De Almeida *et al.*, 2012).

Se han ensayado otras formulaciones en equinos, como la elaboración de premezclas alimenticias de soluciones acuosas de esporas de *D. flagrans*. En el parque zoológico “Marcelle Natureza”, se desparasitaron con ivermectina + praziquantel, cebras, asnos y burros africanos. Durante el año siguiente al tratamiento se les administró una premezcla preparada con concentrado alimenticio a la que se añadieron 2×10^6 clamidosporas *D. flagrans* / Kg pv, y se observaron unos valores de reducción fecal del recuento de huevos de estrongídeos (FEER) que oscilaron entre el 52% y el 95% (Arias *et al.*, 2012c).

1.4.5. Problemática del empleo de hongos como agentes de biocontrol parasitario

a) Efectos adversos

Sobre los caballos

A pesar de que las especies empleadas para el control biológico de parásitos se encuentran de forma natural en el medio, y los caballos las ingieren con el pasto, existen muy pocas experiencias controladas por lo que no se dispone de información acerca de los posibles efectos adversos de la administración de hongos a équidos. Estudios previos realizados en ganado vacuno y porcino revelaron la ausencia de efectos desfavorables (Cortiñas *et al.*, 2015). Es interesante tener en cuenta que los hongos empleados no se desarrollan en el interior de los animales, que en realidad actúan como *vehículos* diseminando los antagonistas de las formas parasitarias en las heces (Arroyo *et al.*, 2015).

Sobre cuidadores/propietarios

Se han publicado algunas investigaciones en las que se indica que aunque no resulta frecuente, se han diagnosticado casos de infección cutánea por *P. lilacinum* en personas en todo el mundo, en la mayoría de los casos en pacientes inmunodeprimidos (Hall *et al.*, 2004), al igual que ha sucedido con algunas especies de *Trichoderma*, que se han mostrado patógenos oportunistas de personas y animales inmunodeprimidos (Kubicek *et al.*, 2008).

A este respecto, es preciso destacar que algunos padecimientos como el cáncer, SIDA, abuso de corticosteroides y antibióticos, han provocado un aumento de las infecciones micóticas en especial de naturaleza intrahospitalaria (Méndez-Tovar *et al.*, 2016). Entre estas también se ha referido la participación de algunas especies del género *Mucor*, responsables de cuadros que cursan con alteraciones de los senos paranasales, cerebro o pulmones en pacientes con inmunosupresión (Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2016).

Sobre el medio

Resulta indudable que el hallazgo de organismos en el suelo que presentan actividad específica frente a formas de propagación de diferentes especies parasitarias de importancia para la salud humana y animal ha supuesto una notable contribución a las posibilidades reales de impulsar programas para el control integrado de infecciones parasitarias. Sin embargo, han surgido algunas controversias acerca de la posible repercusión del empleo de organismos como hongos, sobre la composición de la microbiota telúrica, y en especial sobre las larvas de nematodos de vida libre (no parásitos). Aun teniendo en cuenta el evidente perjuicio que los parásitos causan, se ha llegado a demostrar una total ausencia de actividad de *D. flagrans* sobre larvas de vida libre. Después de añadir esporas del ascomicete a muestras de estiércol y depositarlas en el suelo, Saumell *et al.* (2016) comprobaron que las poblaciones de nematodos no parásitos no resultaban afectadas, determinando además que el hongo no persistía más de 2 meses en este medio. En coprocultivos realizados con muestras de heces de caballos recogidas del suelo a los que se añadieron esporas de *D. flagrans*, no resultó posible evaluar la eficacia del hongo debido a la elevadísima presencia de larvas de vida libre (Palomero, 2015).

b) Aplicabilidad

La demostración de la eficacia parasitocida de algunos hongos que se encuentran en el suelo ha incentivado la búsqueda de formas prácticas para su empleo rutinario. El diseño de medios para la distribución de diferentes estadios de los hongos incluye diferentes aspectos, como la **estimación de las dosis requeridas, producción a gran escala, vías de aplicación y regulación legal**.

En la tabla 8 se resumen las **dosis de esporas** de hongos parasitocidas administradas a caballos. Resulta un poco llamativo este apartado, en nuestra opinión, puesto que en los inicios de los ensayos con animales, se tomó la decisión de formular las dosis en función del peso vivo de los animales, como si se tratase de productos farmacológicos. Esta parece ser una de las razones

del reducido número de estudios realizados, ya que las cantidades a administrar a cada animal son muy elevadas.

Tabla 8.- Dosis de hongos administradas a caballos.

Autores	Parásito	Hongo	Dosis	% Eficacia
Baudena <i>et al.</i> (2000)	Estrongílicos	<i>Duddingtonia flagrans</i>	2×10^6 / Kg pv	66 – 99
Santos <i>et al.</i> (2001)	Ciatostominos	<i>Arthrobotrys oligospora</i> <i>Duddingtonia flagrans</i>	2×10^3 / Kg pv	90
Braga <i>et al.</i> (2009a)	Estrongílicos	<i>Duddingtonia flagrans</i>	0,1 g pellets / Kg pv	82,5
Araujo <i>et al.</i> (2012)	<i>Strongyloides westeri</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i> <i>Monacrosporium thaumasium</i>	100 g pellets	81,2-85,3 76,7-92,2
Arias <i>et al.</i> (2012c)	Estrongílicos	<i>Duddingtonia flagrans</i>	2×10^6 / Kg pv	52-95
Paz-Silva <i>et al.</i> (2015)	Estrongílicos Ascáridos	<i>Duddingtonia flagrans</i> <i>Mucor circinelloides</i>	$1,25 \times 10^4$ / Kg pv	90
Buzatti <i>et al.</i> (2015)	Estrongílicos	<i>Duddingtonia flagrans</i>	$1,5 \times 10^5$ / Kg pv 3×10^5 / Kg pv 6×10^5 / Kg pv	7.04–94.01 12.24-83.87 37.24-98.62

Teniendo en cuenta que los hongos se adaptan a la carga parasitaria presente en las heces, como se ha demostrado para *D. flagrans* y los ciatostominos (Paz-Silva *et al.*, 2011), en el Grupo de Investigación COPAR (GI-2120; USC) se recurrió a administrar a los equinos premezclas alimentarias con cantidades concretas de esporas, de modo que a mayor ingesta de alimento, mayor ingesta de esporas (Arias *et al.*, 2012c), y así la concentración de esporas necesaria se reduce.

La **producción de esporas** para el control biológico de parásitos de animales se ha realizado en medios sólidos, normalmente en placas Petri con medio que contiene agar y cereales (trigo mayoritariamente) (Mendoza *et al.*, 2006). Para extender el empleo de esporas al mayor número de animales posible, es necesario disponer de procedimientos de producción a gran escala. En esta línea, recientemente se han ensayado algunas modificaciones en la composición de medios sólidos, propugnando la adición de meso-inositol o de glucosa al medio (Federica *et al.*, 2013). De este modo se obtuvo una producción media de 51.715.000 clamidosporas de *D. flagrans* por placa con meso-inositol, y 208.760.000 con glucosa. Por el contrario, Da Silva *et al.* (2013) no observaron diferencias en medios con soja, maíz o patata. Arias *et al.* (2013)

analizaron la posibilidad de emplear medios de cultivo líquidos, con objeto de facilitar la mezcla en preparados alimenticios, así como la pulverización directa en el suelo.

En relación con las **vías de aplicación**, la mayoría de las pruebas han consistido en la administración oral de esporas o micelio a los animales, primero en soluciones acuosas, después en pellets de alginato elaborados en el laboratorio, y más recientemente en pellets fabricados de forma industrial, o en bloques nutricionales (bloques minerales) (Ojeda-Robertos *et al.*, 2008, 2009; Braga *et al.*, 2009b; Sagüés *et al.*, 2014; Arroyo *et al.*, 2015). Todas estas formulaciones tienen la ventaja de que antagonistas y parásitos entran en contacto en el medio en el que los patógenos alcanzan el exterior, las heces, lo que asegura la interacción y asegura que los hongos puedan desarrollar su actividad de forma precoz.

Otra opción consiste en la dispersión directamente sobre el suelo; Arias *et al.* (2012b) demostraron que si se pulverizaba medio de cultivo líquido con esporas de *D. flagrans* directamente sobre el suelo de parcelas donde se alimentaban caballos en pastoreo parasitados por strongílidos, la reinfección se retrasaba un mes. Sin embargo, otros autores indicaron que era preciso inocular el material fúngico en el suelo junto con un sustrato específico para su desarrollo (De Mello *et al.*, 2014). Esta vía de distribución abre la posibilidad de emplear los hongos para el control de parásitos en lugares de recreo, parques, areneros, etc.

Por último, los aspectos relacionados con la **regulación** del empleo de hongos para el control biológico de parásitos en animales destinados al consumo contemplan su empleo como aditivos alimentarios, lo que implica la necesidad de realizar una serie de pruebas para asegurar que no van a encontrarse en los alimentos de origen animal. Aunque esto no sería posible, puesto que micelio, conidios, esporas, etc., no se absorben a nivel intestinal, es preciso presentar pruebas objetivas de ello, que resultan muy costosas, y hoy en día esto supone un freno a la comercialización de productos fabricados con material fúngico. Existe un dictamen del Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias empleadas en Alimentación Animal (The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed, FEEDAP), dependiente de la UE, acerca del empleo de clamidosporas de *D. flagrans* en ganado vacuno, en el que se expone la ausencia de toxicidad aguda en ratas (FEEDAP, 2006), y también se menciona que la presencia de clamidosporas en las heces de animales no afecta a organismos como lombrices de tierra o nematodos no parásitos del suelo.

2.- OBJETIVOS

En base a los antecedentes descritos en la sección anterior, se planteó un estudio dividido en tres ensayos, con el fin de alcanzar los siguientes **OBJETIVOS**:

- 1.- Analizar si es necesaria la presencia de larvas vivas de nematodos y con movilidad para la formación de trampas en el micelio de *Duddingtonia flagrans*.
- 2.- Desentrañar el efecto de la adición de antígenos sobre la morfogénesis de esporas de hongos parasitoides.
- 3.- Evaluar las posibilidades de distribuir esporas de hongos parasitoides en pellets nutricionales fabricados de forma industrial.
- 4.- Establecer la eficacia de pellets elaborados con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* para reducir el riesgo de infección por parásitos gastrointestinales en caballos en pastoreo continuo, y analizar la posible aparición de efectos adversos.
- 5.- Estimar el efecto de la administración de esporas de hongos parasitoides en caballos en pastoreo rotacional, y determinar su utilidad para el control integrado de parásitos gastrointestinales.

**3.- ENSAYO I: Estimulación de
la morfogénesis del hongo
atrapanematodos
*Duddingtonia flagrans***

3.1. INTRODUCCIÓN

Se ha señalado con anterioridad que con el empleo de antiparasitarios para el control de estrongídeos, han surgido una serie de problemas relacionados con eficacia inferior a la esperada, y con la creciente aparición de cepas *resistentes* (Lyons *et al.*, 2009), ante esto, apremia la necesidad de disponer de medidas adecuadas para reducir la supervivencia de las fases libres de los parásitos (ooquistes, huevos, metacercarias, larvas...), como parte de un programa para el control integrado de estos patógenos. En esta línea, existen algunas recomendaciones que indican la conveniencia de retirar manualmente las heces de los prados, o la terapia selectiva de los equinos, que únicamente recibirían tratamiento antiparasitario en el caso de que superasen un valor predeterminado de eliminación de huevos por gramo de heces (Larsen *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2012).

En estudios llevados a cabo en diferentes países como Dinamarca, Malasia, México, Ucrania, Irlanda, Argentina o Brasil, se ha descubierto la presencia en el suelo de hongos atrapanematodos (Duddington, 1951; Fernández *et al.*, 1999; Chandrawathani *et al.*, 2004; Kuzmina *et al.*, 2006; Sagüés *et al.*, 2011; Braga *et al.*, 2011), que desarrollan una actividad saprófita y se nutren de materia orgánica en descomposición. Bajo ciertos estímulos, tiene lugar un cambio en su actividad nutritiva, y estos hongos se convierten en predadores que se alimentan de larvas de nematodos parásitos (Nordbring-Hertz, 1977; Bogús *et al.*, 2005).

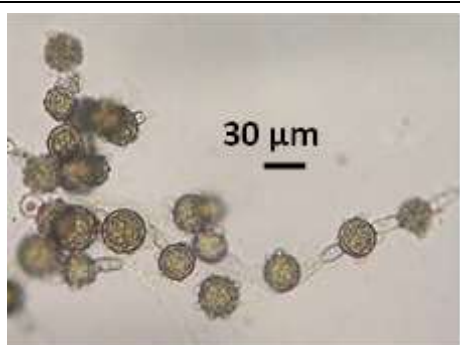


Fig. 27.- Clamidosporas de *D. flagrans*.

Una de las especies de hongos atrapanematodos más conocida es *Duddingtonia flagrans* (anteriormente denominada *Arthrobotrys flagrans*), entre sus características destaca la capacidad de producir gran cantidad de clamidosporas dotadas de una cubierta muy gruesa (Fig. 27), que las protege durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal de algunos animales. Esta

característica hace que su adición al alimento de los animales consituya una alternativa sólida de futuro para el control de ciertos parásitos (Mendoza de Gives *et al.*, 2006). Tras su ingestión, las clamidosporas salen al exterior con las heces, donde germinan y dan lugar a un micelio en el que se forman una serie de *trampas* de diferente diámetro, en el que quedan atrapadas las larvas de los estrongídeos (Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Paz-Silva *et al.*, 2011).

No se han aclarado aun los mecanismos que influyen en la morfogénesis de estructuras de captura, aunque tradicionalmente se ha defendido la implicación de un conjunto de elementos presentes en la cutícula de nematodos, denominado *nemina* (Pramer y Stoll, 1959; Balan y Lechevalier, 1972; Barron, 1977; Nordbring-Hertz, 1977). Algunas investigaciones señalan que *D. flagrans* únicamente activa su desarrollo para elaborar trampas y producir clamidosporas, cuando está en contacto físico con larvas de nematodos vivos en movimiento (Grønvold et al., 1996; Araújo, 1998; Bogús et al., 2005). Sin embargo, existen trabajos en los que se demostró que un único ejemplar de nematodo (*Panagrellus redivivus*), seco y muerto, estimulaba la formación de gran cantidad de trampas por *Dactylella doedycoides* (Feder et al., 1960). En un trabajo posterior, al poner en contacto distintas especies de *Dactylella* con el medio que resultó de cultivar 100.000 nematodos, se comprobó que las diferentes especies tenían desigual capacidad para formar trampas (Feder et al., 1963). Monoson et al. (1974) mostraron que el extracto de nemina obtenida de cinco nematodos diferentes inducía la formación de trampas.

Estudios realizados con *Arthrobotrys oligospora* confirmaron que distintos péptidos eran capaces de inducir la formación de trampas, y que el grado de estrés en la nutrición era de importancia crítica en la formación de clamidosporas (Nordbring-Hertz, 1977). A similares conclusiones habían llegado Bartnicki-García et al. (1964) al estudiar la influencia de la concentración de CO₂ sobre la morfogénesis de dos cepas de *A. conoide*. Sin embargo, distintos experimentos citados por Barron (1977) señalaron que las trampas se forman de forma espontánea en cantidades moderadas, y que no son precisos estímulos.

Para que pueda materializarse el control biológico de parásitos mediante hongos, se requiere la obtención de esporas a gran escala, lo que no parece posible si son imprescindibles los estímulos que proporcionan los nematodos vivos. Resulta necesario profundizar en el conocimiento de la necesidad o no de contar con estímulos y la naturaleza de éstos, para que los hongos atrapanematodos formen trampas y esporas.

El **objetivo** de este ensayo fue **evaluar el grado de desarrollo de *D. flagrans* en presencia de especímenes muertos de trematodos (*F. hepatica*, *C. daubneyi*) y nematodos (*Anisakis* spp.), y sus correspondientes antígenos de excreción/secreción.**

3.2. MATERIAL y MÉTODOS

3.2.1. Obtención de clamidosporas de *D. flagrans*

Se emplearon clamidosporas de la cepa mexicana FTHO-8 (Mendoza de Gives *et al.*, 2006), que se mantuvieron en placas Petri con agar-trigo. Este medio se preparó añadiendo 20 g de harina de trigo y 20 g de agar bacteriológico por cada litro de agua destilada, que posteriormente se sometió a autoclave (121°C / 15 min) para su esterilización. Una vez que el medio enfrió hasta 40-50°C, en la cámara de flujo laminar se procedió a verterlo en placas Petri de 9 cm de diámetro. La propagación de las esporas se llevó a cabo introduciendo *insertos* de 7x7 mm obtenidos a partir de una placa madre en placas Petri con medio agar-trigo.

3.2.2. Experimento I: estimulación de esporogénesis con antígenos de excreción/secreción de helmintos adultos

Los ejemplares de trematodos *F. hepatica* y *C. daubneyi* se consiguieron del hígado y rumen de vacas sacrificadas en un matadero de Lugo, y las larvas 3 de *Anisakis* spp. se extrajeron directamente de huevos de merluza (*Merluccius merluccius*) que se adquirieron en una pescadería de esta misma ciudad.

Todos los parásitos se lavaron cuatro veces en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH= 7,4) antes de cultivarse en medio líquido RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Para obtener los productos metabólicos o antígenos de excreción/secreción (ESP), los trematodos se mantuvieron a 37°C y atmósfera modificada con 5% CO₂ durante 48 horas, en el caso de las larvas de *Anisakis* spp, la temperatura fue de 17°C. Los medios de cultivo se renovaron cada 8-10 h.

De cada antígeno, se recogieron 9 alícuotas, que se juntaron antes de proceder a su diálisis extensiva frente a agua destilada durante 1 día (Sánchez-Andrade *et al.*, 2010). A continuación se liofilizaron, y finalmente se estimó su concentración proteica mediante el kit BCA[®] (Pierce, Rockford, IL, USA).

Los ESP se diluyeron en PBS hasta lograr una concentración de 200 µg/mL. A continuación se dispusieron insertos de *D. flagrans* en un borde de un total de 40 placas Petri con agar-trigo,

colocando en el borde opuesto 100 μL de cada antígeno (se realizaron 10 replicados). Se mantuvo un grupo de 10 placas sin antígeno, como testigos, y todas las placas se mantuvieron a 25°C y oscuridad durante 24 días.

3.2.2. Experimento II: estimulación de esporogénesis con helmintos adultos

Una vez obtenidos los ESP, los trematodos adultos y las larvas de *Anisakis* se congelaron a -35°C durante 4 días. Posteriormente, se sembraron placas Petri con un inserto del hongo colocado en un borde, y en el extremo opuesto se colocaron los especímenes inertes de *F. hepatica* (2), *C. daubneyi* (2), y *Anisakis* spp. (100). El número de especímenes se estableció en función del peso, para asegurar que se colocaba una masa (4 mg) aproximadamente igual de parásitos en cada placa. Se utilizaron 10 replicados para cada helminto, incluyéndose un lote de 10 placas en las que no se colocaron parásitos, los testigos. Todas las placas se mantuvieron durante 24 días en oscuridad y 25°C.

3.2.3. Evaluación de la formación de trampas y clamidosporas

Con objeto de establecer el grado de desarrollo del micelio de *D. flagrans* en los dos ensayos, se marcaron en el fondo de cada placa 10 círculos de 2 cm^2 , y se realizaron los recuentos en un microscopio óptico (40X).

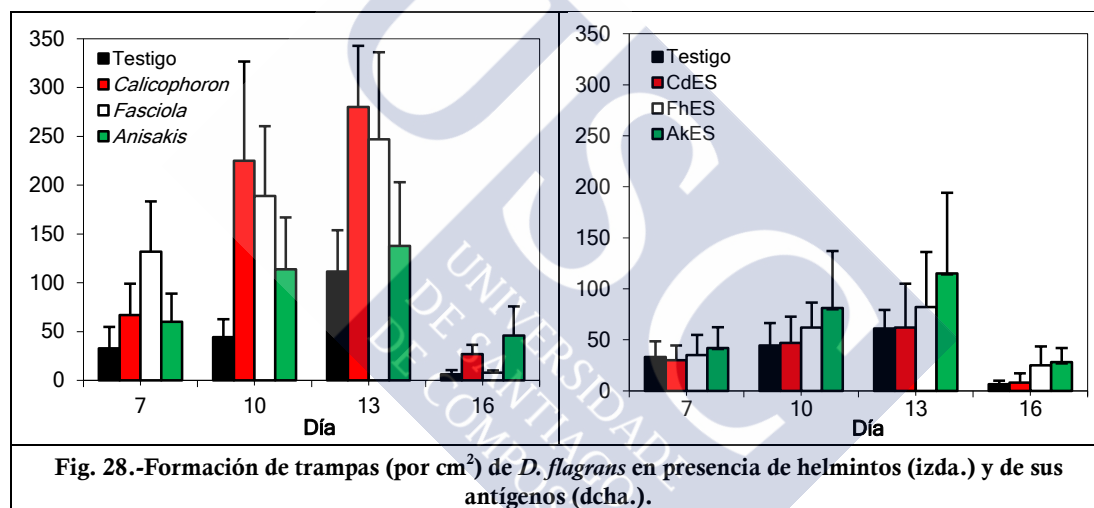
3.2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se examinaron con Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de significación de $P < 0,05$. Se empleó el test de Pearson para evaluar las posibles correlaciones entre las diferentes variables. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS, versión 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.3.1. Desarrollo del micelio de *D. flagrans*

En presencia de los helmintos muertos se observó crecimiento de las hifas a partir del día 7 de la inoculación del inserto de micelio, y a continuación se mostró un incremento lineal hasta que transcurrieron 13 días, y a continuación disminuyó (Fig. 28). En las placas en las que se colocaron antígenos de excreción/secreción de helmintos, la producción de trampas siguió un patrón similar aunque la morfogénesis fue menor (Fig. 28). La adición de ESP de *Anisakis* estimuló la mayor elaboración de trampas en las hifas, pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en relación con el origen de los antígenos ($F=1,497$, $P=0,209$).



Como se representa en la figura 28, la colocación de helmintos en las placas provocó un mayor estímulo para la producción de trampas que al añadir ESP ($F=8,930$, $P=0,003$). Los valores más elevados de trampas en las hifas se observaron entre los días 10 y 13, siendo mayores en presencia de adultos de *F. hepatica* y *C. daubneyi*. Se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de trampas en las placas con helmintos y en las testigo ($F=3,519$, $P=0,010$). Hacia el final del periodo de crecimiento (>15 días), la producción de trampas disminuyó rápidamente.



Los hongos atrapanematodos como *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* o *Monacrosporium* reciben esta denominación por su capacidad para reducir las poblaciones de algunos nematodos en el suelo, y en consecuencia el riesgo de infección de animales en pastoreo (Waller *et al.*, 1994; Baudena *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la morfogénesis de hongos predadores incluye el crecimiento de micelio, formación de trampas y finalmente elaboración de esporas. En investigaciones previas se ha sugerido que la formación de trampas puede estar inducida por un déficit de nutrientes, en tanto que la producción de clamidosporas tendría lugar ante condiciones adversas de crecimiento (Scholler y Rubner, 1994; Anan'ko y Teplyakova, 2011). Según algunos investigadores, la transición del estadio saprófito al predador depende de la presencia de nematodos vivos, considerándose además imprescindible que las larvas se muevan para inducir la formación de trampas (Grønvold *et al.*, 1996). Los resultados mostrados en el presente estudio señalan que algunos productos liberados por helmintos estimulan la formación de trampas, al igual que la presencia de formas inertes, y corroboran las conclusiones a las que llegaron Feder *et al.* (1960, 1963), al poner en contacto *Dactylella doedycoide* con medio de cultivo o ejemplares muertos de nematodos. En el presente ensayo, el mayor estímulo para la elaboración de trampas ocurrió al colocar fasciolas y paramphistómidos adultos.

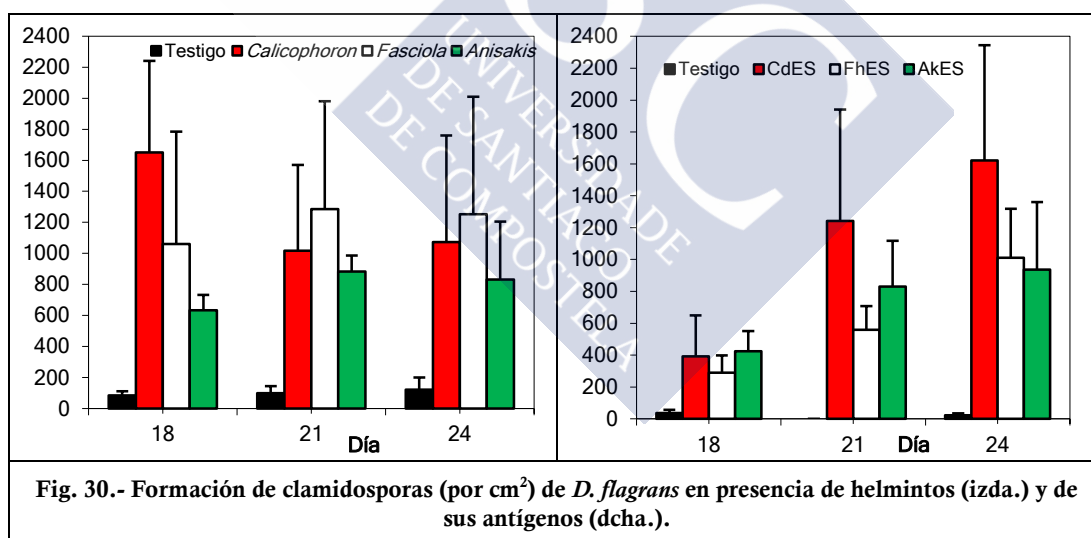
La observación de trampas en las placas testigo, aunque en menor número que en aquellas que contenían nematodos o sus productos de ESP, concuerda con los experimentos citados por Barron (1977), en los que se afirma que el estímulo para la morfogénesis no siempre es necesario.

3.3.2. Producción de clamidosporas de *D. flagrans*

En relación con la producción de clamidosporas, la suplementación de las placas con helmintos adultos provocó con mayor rapidez un mayor incremento en la producción de clamidosporas que con los ESP ($F= 4,363$, $P= 0,038$) (Figs. 30-31), sobre todo con los trematodos *F. hepatica* y *C. daubneyi*, alcanzándose los recuentos más elevados a los días 18-19 ($F= 3,330$, $P= 0,013$). Se comprobó una producción de clamidosporas significativamente superior en presencia de trematodos adultos que en nematodos ($F= 6,351$, $P= 0,014$).

A los 24 días de la adición de los productos metabólicos (ESP) se obtuvieron los valores máximos de clamidosporas en las placas Petri, en especial las estimuladas con los ESP de *C. daubneyi* (Fig. 30), en este momento la cantidad de clamidosporas fue similar a la obtenida en las placas que contenían los parásitos. Las diferencias con los recuentos de las placas testigo resultaron significativas ($F= 3,448$, $P= 0,011$).

En las placas testigo no aparecieron clamidosporas hasta transcurridos 16-17 días de la colocación del inóculo.



Estos resultados confirman los hallazgos obtenidos al valorar el crecimiento del micelio y demuestran que el desarrollo de las clamidosporas de *D. flagrans* se produce tanto en presencia de nematodos (Fig. 31) o trematodos inertes, como de sus productos de excreción/secreción, y supone un avance muy importante que podría ser aprovechado para la producción masiva de clamidosporas en medios de cultivo apropiados, que haría posible la distribución de este hongo entre un gran número de animales.



Teniendo en cuenta la capacidad de *D. flagrans* para sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal de herbívoros monogástricos (Larsen *et al.*, 1995) y rumiantes (Chandrawathani *et al.*, 2002; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008), la administración por vía oral parece ser una medida muy acertada para asegurar que entran en contacto las formas de propagación de algunos parásitos con sus antagonistas. Asimismo, los resultados obtenidos mediante la adición de antígenos de trematodos (incremento de 1,5-4 en la producción de clamidosporas) señalan que se trata de un mecanismo muy interesante para conseguir grandes cantidades de clamidosporas, que debería ser explorado en estudio posteriores.

Un aspecto que requiere mayor discusión es el hecho de que los resultados mostrados se obtuvieron con adultos/antígenos de trematodos y larvas de anisákidos, organismos que en la naturaleza nunca van a entrar en contacto con *D. flagrans*. La explicación más plausible podría residir en la existencia de compuestos comunes a los helmintos empleados, tanto en su tegumento o cutícula, como en los productos que liberan. El concepto de inmunidad cruzada que tiene lugar en hospedadores mamíferos frente a la infección por diferentes helmintos se explica precisamente, en parte, porque comparten elementos antigénicos (Romasanta *et al.*, 2003; Fan y Su, 2004). Este hallazgo, además de bastante sorprendente, resulta de gran utilidad no sólo porque aporta información acerca de los mecanismos involucrados en la morfogénesis del ascomicete, sino porque ofrece una posible solución para estimular la producción de clamidosporas a gran escala. En ensayos previos, Arias *et al.* (2013) constataron que la adición de una proteína recombinante del tegumento de *F. hepatica* (FhrAPS) incentivaba significativamente la creación de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en un medio líquido (COPFr; patente PCT/ES2014/070110).

**4.- ENSAYO II: Alimentación de
caballos con pellets elaborados de
forma industrial con esporas de
hongos parasiticidas**

4.1. INTRODUCCIÓN

Cuando los caballos se mantienen en pastoreo existe un riesgo importante de que sufran infecciones parasitarias, principalmente por cestodos y nematodos (Lyons *et al.*, 2007; Relf *et al.*, 2013; Rehbein *et al.*, 2013); también existe la posibilidad de que ingieran metacercarias de *Fasciola hepatica* (Arias *et al.*, 2012a; Soykan y Oge, 2012; Sanchís *et al.*, 2015). Los huevos de *Parascaris* spp. que contienen larvas L2 provoca la infección por vía oral de equinos, sobre todo los potros menores de 15 meses, aunque también se han detectado caballos adultos con parascariosis (Francisco *et al.*, 2009; Larsen *et al.*, 2011; Burk, 2013). La infección por strongílidos tiene lugar cuando los caballos ingieren larvas de 3^{er} estadio (L3) con el pasto, donde éstas pueden sobrevivir al menos durante tres meses bajo condiciones apropiadas, sobre todo humedad elevada y temperatura cálida (Corning, 2009).

Teniendo en cuenta que en las zonas de pasto existen estadios de vida libre de diferentes parásitos responsables de la infección, la administración de antihelmínticos a caballos proporciona una solución temporal, de ahí la necesidad de incrementar la frecuencia de desparasitación. En diferentes estudios se ha demostrado que el uso excesivamente frecuente de fármacos antihelmínticos es una de las causas de desarrollo de resistencia en gran parte de las poblaciones de nematodos parásitos (Reinemeyer, 2009; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Canever *et al.*, 2013).

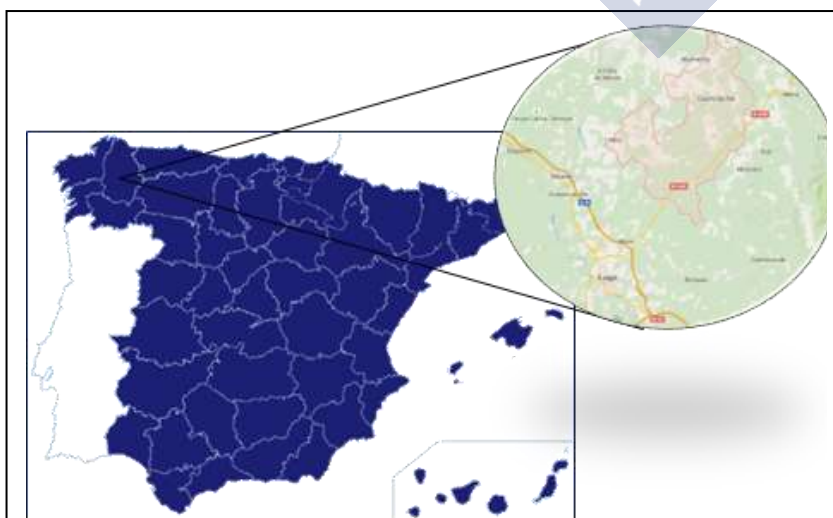
Con el propósito de superar esta situación, se han sugerido diferentes medidas, entre las que destaca la *terapia selectiva*, que consiste en la desparasitación de los caballos que superan un valor predeterminado de eliminación de huevos en heces (Uhlinger, 2007; Francisco *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2014). Otros intentos recurren a procedimientos de control biológico, a través de la distribución de hongos parasitoides en el ambiente. Esta idea se fundamenta en especial en los resultados obtenidos con el empleo de hongos atrapanematodos como *Duddingtonia flagrans* o *Monacrosporium thaumasium*, frente a las larvas de nematodos strongílidos (Fernández *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2004). No es abundante la información acerca de la utilización de hongos predadores (ovicidas) frente a huevos de trematodos, cestodos o ascáridos, y la mayoría aluden a *Pochonia chlamydosporia* (Silva *et al.*, 2010a; de Carvalho *et al.*, 2014). En investigaciones recientes se ha destacado la capacidad de *Mucor circinelloides* para destruir huevos de *Fasciola hepatica* y *Parascaris equorum* en heces de animales infectados (Arroyo *et al.*, 2016).

No hay duda de que la administración oral resulta muy adecuada porque permite el contacto en las heces de los hongos y los huevos o larvas de los parásitos. Hasta el momento, se han preparado suspensiones de clamidosporas en agua, que se han proporcionado a los animales por vía oral o mezcladas con suplementos alimenticios (Terrill *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2006; Ojeda-Robertos *et al.*, 2008; Sagüés *et al.*, 2011). Otra opción consiste en la inclusión de micelio en pellets de alginato sódico, esta formulación de las esporas de *D. flagrans* y *M. thaumasium* a animales permitió comprobar la eficacia de los hongos en regiones templadas y tropicales (Braga *et al.*, 2009b; Tavela *et al.*, 2013).

La alimentación con pellets es frecuente porque constituye un modo de asegurar una ración completa y equilibrada, y los caballos no tienen posibilidad de elegir o descartar alimentos. Algunas investigaciones han puesto de manifiesto la capacidad *in vitro* que tienen las esporas de *Mucor circinelloides* o *D. flagrans* para sobrevivir a las condiciones del proceso de fabricación de concentrado alimenticio en forma de pellets, sin que resulte afectada su actividad biológica (Arias *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2016). Pero no se ha explorado hasta el momento, si las esporas de estos hongos parasitocidas mantienen sus propiedades larvicidas u ovicidas al añadirlas durante la elaboración industrial de pienso.

El **objetivo** del presente ensayo consistió en **analizar el efecto preventivo de la infección por nematodos en caballos que se alimentaron con pellets elaborados con una mezcla de esporas de *Mucor circinelloides* y *D. flagrans*.**

4.2. MATERIAL y MÉTODOS



Este estudio se desarrolló en las instalaciones que la Diputación Provincial de Lugo posee en Castro Riberras de Lea (Lugo, NO España, 43°15'83"N - 7°05'0"O) (Fig. 32).

Fig. 32. El presente estudio se llevó a cabo en Castro Riberras de Lea (Lugo).

4.2.1. Hongos parasitoides

Se emplearon dos especies de hongos de probada actividad parasitoides, *Mucor circinelloides* (ovicida) y *Duddingtonia flagrans* (larvicida) (Cortiñas *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2015). Para obtener las esporas, ambos hongos se cultivaron de forma simultánea en el medio líquido COPFr durante 1,5-2 meses a temperatura ambiente, hasta alcanzar concentraciones superiores a 10^8 esporas / L medio (Arias *et al.*, 2013).

4.2.2. Producción de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*

La decisión de emplear un medio de cultivo líquido se tomó teniendo en cuenta que hasta el momento, la propagación de esporas de hongos parasitoides (*D. flagrans*) se hacía en medios sólidos a base de agar bacteriológico (Mendoza de Gives *et al.*, 2005), que obviamente no constituye un elemento frecuente en la dieta de los equinos, de forma que considerando una posible distribución comercial, no implicase el desarrollo de ensayos adicionales para demostrar la ausencia de efectos adversos sobre la salud de los caballos. También se consideró que sería más sencillo obtener un producto final homogéneo si las esporas se añadían en solución acuosa al resto de los componentes de los pellets; finalmente, la última premisa estimada fue que el cultivo líquido prevenía la posible presencia de ácaros que pueden alimentarse de hongos, y que no crecen en medio acuoso (Arias *et al.*, 2013).

Como ya ha sido publicado previamente, el medio COPFr se prepara añadiendo a 1 L de agua destilada, 30,6 gramos trigo autóctono (*Triticum aestivum*), 7,1 g NaCl, 1,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,423 mg proteína FhrAPS (proteína recombinante de *F. hepatica*). Se preparan 5 L del medio COPFr, que se introducen en un bidón de nalgene y se someten a autoclave /121°C, 20 min.). Después de enfriar, se añaden los inóculos de los hongos, para lo cual se incorporan 50 mL de un cultivo previo. Los bidones se mantienen a temperatura ambiente (18-22°C) durante 20-45 días, transcurridos los cuales se obtiene un rendimiento mínimo de $100 \pm 8 \cdot 10^6$ esporas de hongos / L medio de cultivo.

Es importante destacar que se tuvieron en cuenta los resultados del ensayo anterior (*cfr.* 54) en relación con la obtención de mayores cantidades de esporas en presencia de antígenos de trematodos. La adición de la FhrAPS, proteína recombinante del tegumento de *F. hepatica* obedeció a la posibilidad de expresarla en nuestro laboratorio (Paz-Silva *et al.*, 2005).

4.2.2. Diseño experimental

Se distribuyeron 21 yeguas Pura Raza Galega (PRG) (2-8 años) de forma aleatoria en tres grupos de siete animales cada uno (Fig. 33). Estos caballos autóctonos en su hábitat originario se alimentan de pastos naturales en montes y áreas boscosas, en un régimen denominado *silvopastoreo*; debido a las dificultades que presenta su manejo, una de las formas de desparasitación más adecuadas es la administración tópica de lactonas macrocíclicas (Francisco *et al.*, 2009; Sánchez, 2012).



Fig. 33.- Se emplearon 21 yeguas PRG, que se dividieron en tres grupos.

La composición de los tres grupos fue la siguiente:

- G-P: yeguas desparasitadas con 1 mg de ivermectina *pour on* / Kg pv. (Noromectin 0.5%, Norbrook Laboratories, UK). Recibieron diariamente pellets con esporas de hongos.
- G-T: yeguas desparasitadas con 1 mg de ivermectina *pour on* / Kg pv. (Noromectin 0.5%, Norbrook Laboratories, UK). Se alimentaron diariamente con pellets sin esporas de hongos.
- G-C: yeguas que se mantuvieron sin desparasitar, como testigos, a las que se les proporcionaron diariamente pellets sin esporas de hongos.

Cada grupo se mantuvo en tres praderas cercadas de una superficie aproximada de tres hectáreas, que contaban con bebederos, comederos y refugios de madera para guarecerse. Los caballos dispusieron de agua *ad libitum*, y recibieron cada día 2,5 Kg de concentrado en pellets. En las épocas de escasez de pasto (diciembre-febrero y julio-agosto) se suplementaron con heno.

4.2.3. Elaboración industrial de pellets con esporas de hongos parasitoides

Como se indicó anteriormente, se proporcionó a los caballos de los grupos G-T y G-C un concentrado alimenticio comercial en forma de pellets (*ProHorse Club*®, Nanta, Begonte, España), a base de granos de cereal y subproductos, semillas de especies oleaginosas, subproductos del procesamiento de caña de azúcar, minerales, forrajes y aminoácidos. La composición analítica se resume en la Tabla 9.

Materia	Proteína bruta	Grasa bruta	Fibra bruta	Calcio	Fósforo	Sodio	Magnesio	Vit. A	Vit. D3	Vit. E
Riqueza	14%	2,90%	12,50%	1,50%	0,65%	0,53%	0,54%	10000 UI / Kg	1500 UI / Kg	42 UI / Kg

Cada tres meses se fabricó un lote de concentrado con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, a razón de 2×10^6 esporas de cada hongo/ Kg, que se añadieron durante la fase de mezcla de los ingredientes, previamente al acondicionamiento que se realiza con vapor de agua a 75°C durante 90 segundos, cuando la mezcla va a pasar al pelletizador (Figs. 34-36). El producto final se enfrió, se secó y se empaquetó en sacos de 25 Kg.

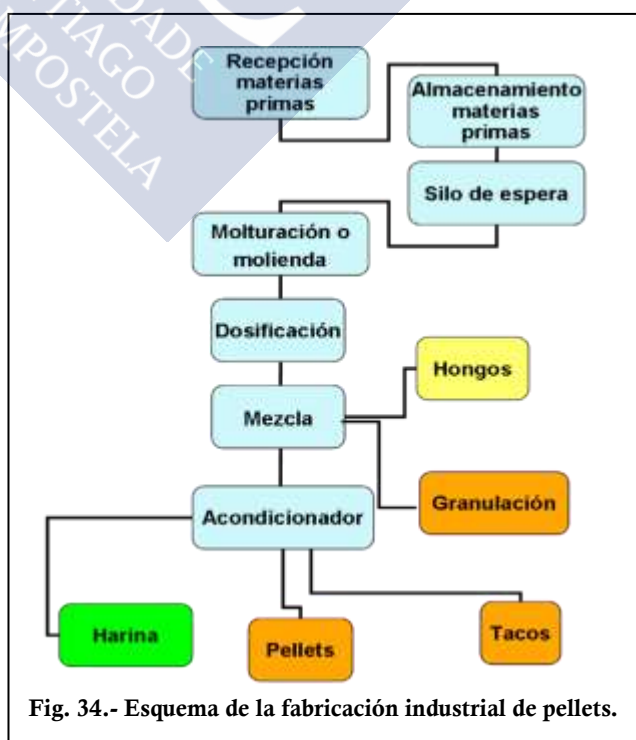


Fig. 34.- Esquema de la fabricación industrial de pellets.

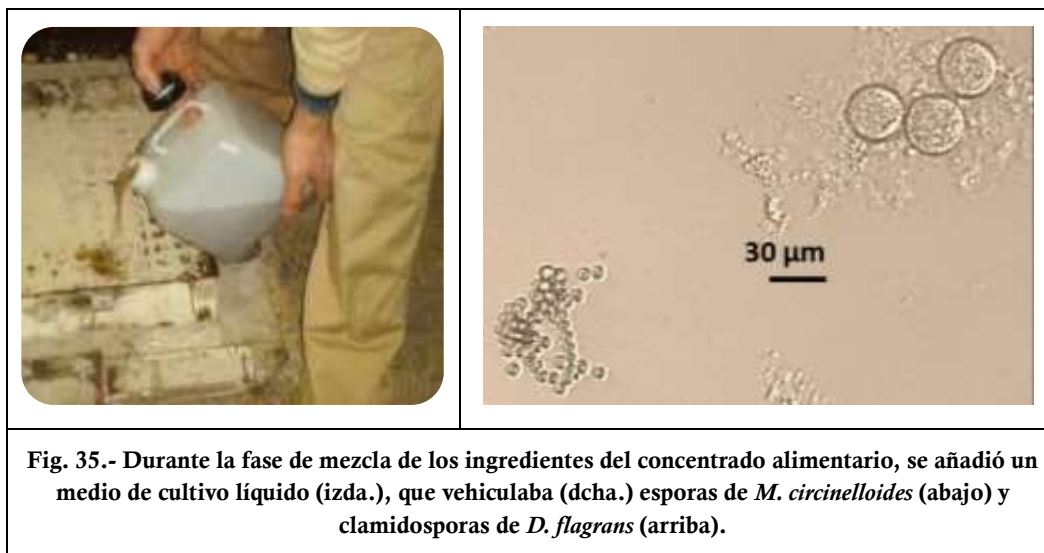


Fig. 35.- Durante la fase de mezcla de los ingredientes del concentrado alimentario, se añadió un medio de cultivo líquido (izda.), que vehiculaba (dcha.) esporas de *M. circinelloides* (abajo) y clamidosporas de *D. flagrans* (arriba).



Fig. 36.- El concentrado pelletizado se envasó en sacos de 25 Kg, en cuya etiqueta figuraban, además de la composición, una indicación acerca de su contenido en esporas de hongos parasitocidas, y de su destino de uso final para experimentación.

4.2.4. Análisis coprológicos

Durante un periodo de 14 meses, se recogieron heces directamente del recto de cada yegua, y una vez en el laboratorio se analizaron muestras de 5 g con la prueba de flotación en solución salina ($\rho = 1,20 \text{ g / L}$) (Sensibilidad: 30 huevos por gramo de heces, HPG) (Francisco *et al.*, 2009), para establecer la dinámica de eliminación de huevos en las heces de los individuos de cada grupo. Con las heces de la primera toma de muestras, se prepararon coprocultivos, mezclando 15-20 g de heces de cada yegua y grupo, e incubando a 22-25°C durante 20 días. Se realizaron cuatro replicados en cada grupo, y transcurrido este tiempo, las L3 se recogieron mediante la técnica de Baermann, y se identificaron al microscopio óptico conforme a claves morfológicas (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008).

La eficacia de la estrategia desarrollada se estableció mediante la reducción de los recuentos fecales de huevos (*Faecal Egg Count Reduction*, FECR), así como del número de caballos positivos a la flotación (CPF) (Francisco *et al.*, 2012):

$$\text{FECR (\%)} = [1 - (\text{Recuento fecal}_{\text{post-tratamiento}} / \text{Recuento fecal}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

$$\text{CPF (\%)} = [1 - (\text{nº caballos positivos}_{\text{post-tratamiento}} / \text{caballos positivos}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

Para delimitar el periodo de reaparición de huevos en heces (*Egg Reappearance Period*, ERP), se tuvo en cuenta la semana post-tratamiento en la que el FECR se hacía inferior al 90% (IC 95%) (Nielsen *et al.*, 2013).

4.2.5. Análisis sanguíneos

Al mismo tiempo que se obtenían las muestras de heces, se tomó una muestra de sangre de la vena yugular en tubos con anticoagulante EDTA, que posteriormente se analizaron con un contador celular automatizado Abacus Junior Vet (Barcelona, España) para obtener los valores de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, así como los recuentos de leucocitos y los porcentajes de linfocitos, granulocitos y monocitos.

4.2.6. Efectos adversos

Con el propósito de descartar la aparición de efectos adversos tras la adición de las esporas a los pellets, se prestó atención a la posible detección de olor desagradable, consistencia o sabor anormal, que provocasen que las yeguas del G-P rehusasen la ingesta de concentrado.

Para asegurar que los pellets con esporas no provocaban alteraciones en las yeguas del G-P, se comprobó que tenían apetito normal, que no estornudaban o presentaban constipación, diarrea o deshidratación. Se prestó atención a la función respiratoria observando posibles signos como tos, descarga nasal, temperatura o respiración anormales, disnea de esfuerzo después de realizar ejercicio. También se exploró la funcionalidad reproductora, en base a que las yeguas presentasen ciclos estrales durante todo el estudio. Finalmente, el estudio se completó con el examen de la piel.

4.2.7. Análisis estadístico

Los valores del FECR y CPF se expresaron como porcentajes con el intervalo de confianza (IC) al 95%. La cinética de eliminación de HPG se representó como la media y la desviación estándar.

Dado que se comprobó con la prueba de Levene que los valores de excreción fecal de huevos de nematodos no se ajustaba a una distribución normal (Estadístico= 8,127, $P= 0,001$), se emplearon las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y “U” de Mann-Whitney ($\alpha= 0.05$) (Francisco *et al.*, 2012).

Los valores de FECR y CPF sí se distribuyeron de forma normal, y se analizaron con ANOVA. Se consideró que existían diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS versión 20.0 (Chicago, IL, USA).



4.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.3.1. Análisis coprológicos

En la primera semana de estudio se observaron huevos de *P. equorum* y de estrongídeos en las heces de las yeguas. Mediante la realización de coprocultivos, se identificaron larvas L3 que correspondían a *Cyathostomum sensu latum* tipo A (63%), tipo B (1%), tipo C (12%), tipo D (19%) y tipo H (1%), y *Gyalocephalus capitatus* (4%) (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008).

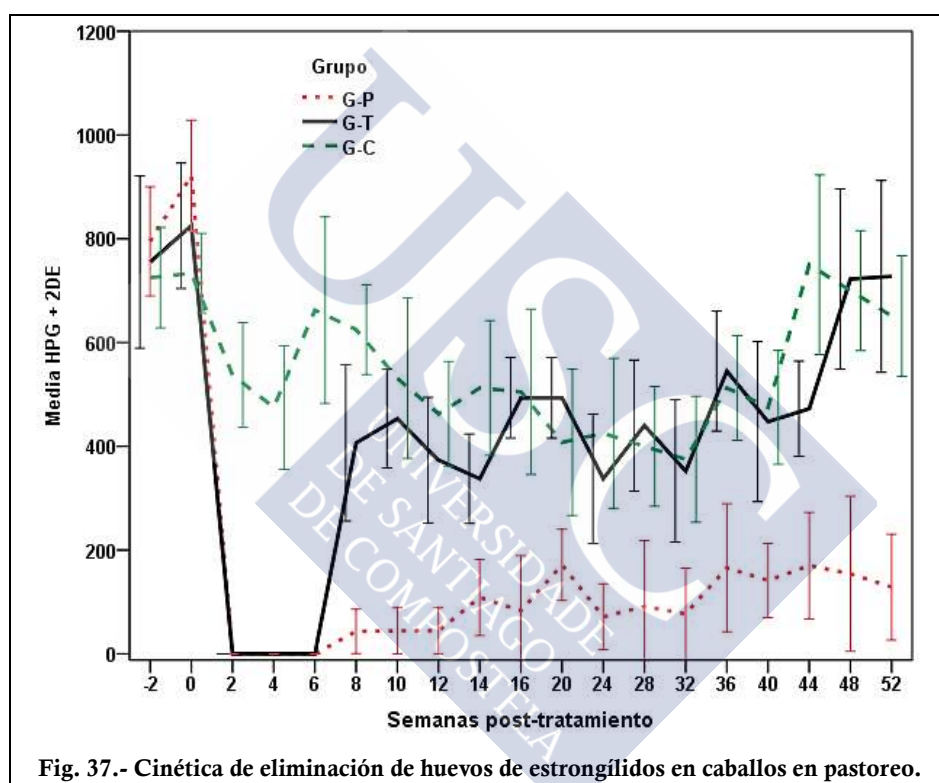


Fig. 37.- Cinética de eliminación de huevos de estrongídeos en caballos en pastoreo.

Al inicio del estudio los porcentajes de caballos que eliminaban huevos de *P. equorum* oscilaron entre el 14% y el 29%, y todos excretaban huevos de estrongídeos, observándose valores superiores a 500 HPG en los tres grupos (Fig. 37). Dos semanas después de la administración de ivermectina (IVM) a los caballos del G-P y G-T, no se detectaron huevos de *P. equorum*, y los valores de FECR y CPF fueron del 100%. Desde este momento y hasta el final del estudio, no volvieron a aparecer huevos del ascárido en las heces de los caballos tratados; en los testigos no tratados se observó una excreción discontinua con recuentos de 0-150 HPG. Estos resultados coinciden parcialmente con investigaciones previas en las que se administró la lactona macrocíclica por vía oral (Lind *et al.*, 2007; Schougard y Nielsen, 2007; Lyons *et al.*,

2008; Larsen *et al.*, 2011). Los caballos PRG no suelen desparasitarse, porque su inmovilización es complicada. En estudios previos se demostró que la ivermectina administrada por vía tópica resultaba eficaz frente a estrongílicos y ascáridos en caballos, y que no provocaba efectos adversos (Francisco *et al.*, 2009, 2011).

A pesar de la eficacia de diferentes antihelmínticos disponibles comercialmente, el efecto de la desparasitación es corto si los caballos se mantienen en el mismo pasto, debido a la presencia de estadios parasitarios de vida libre que provocan la reinfección, esta situación refuerza la necesidad de aplicar medidas preventivas que reduzcan la contaminación del medio.

En base a los hallazgos de ensayos previos acerca de la capacidad de las esporas de ciertos hongos para sobrevivir y mantener sus propiedades biológicas después de la extrusión industrial de pellets nutricionales (Cortiñas *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2016), en el presente ensayo se analizó una nueva estrategia para reducir el riesgo de infección por estrongílicos. Para ello, se elaboraron industrialmente pellets con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, que se administraron a yeguas PRG previamente desparasitadas con ivermectina por vía tópica. Los recuentos fecales de huevos de estrongílicos de las yeguas del G-P (tratados y alimentados con pellets con esporas), variaron entre 44 (8ª semana post-tratamiento, spt) y 247 HPG (48ª spt) (Fig. 37). En contraste, en el grupo testigo del tratamiento (G-T; yeguas tratadas y alimentadas con pellets sin esporas), los valores de eliminación de huevos de estrongílicos aumentaron de forma significativa a partir de la 8ª spt y a las 20 semanas de estudio alcanzaron un patrón similar al del G-C (testigos sin desparasitar y que recibieron pienso sin esporas), oscilando entre 310 (20ª spt) y 773 HPG (48ª spt) (Fig. 37). Se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores del G-P y G-T ($U = -11,166$, $P = 0,001$) y del G-P y G-C ($U = -11,532$, $P = 0,001$). En estudios previos en los que se administró ivermectina a los caballos y pellets con micelio de *D. flagrans*, se comprobó una reducción significativa de los recuentos fecales de estrongílicos durante seis meses (30,5-73,2% con *D. flagrans*, 35,2-87,5% con *Monacrosporium thaumasium*) (Braga *et al.*, 2009b; Tavela *et al.*, 2011). Se han obtenido notables resultados al proporcionar esporas de *D. flagrans* mezcladas con el alimento (Larsen *et al.*, 1996; Mendoza de Gíves *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2013).

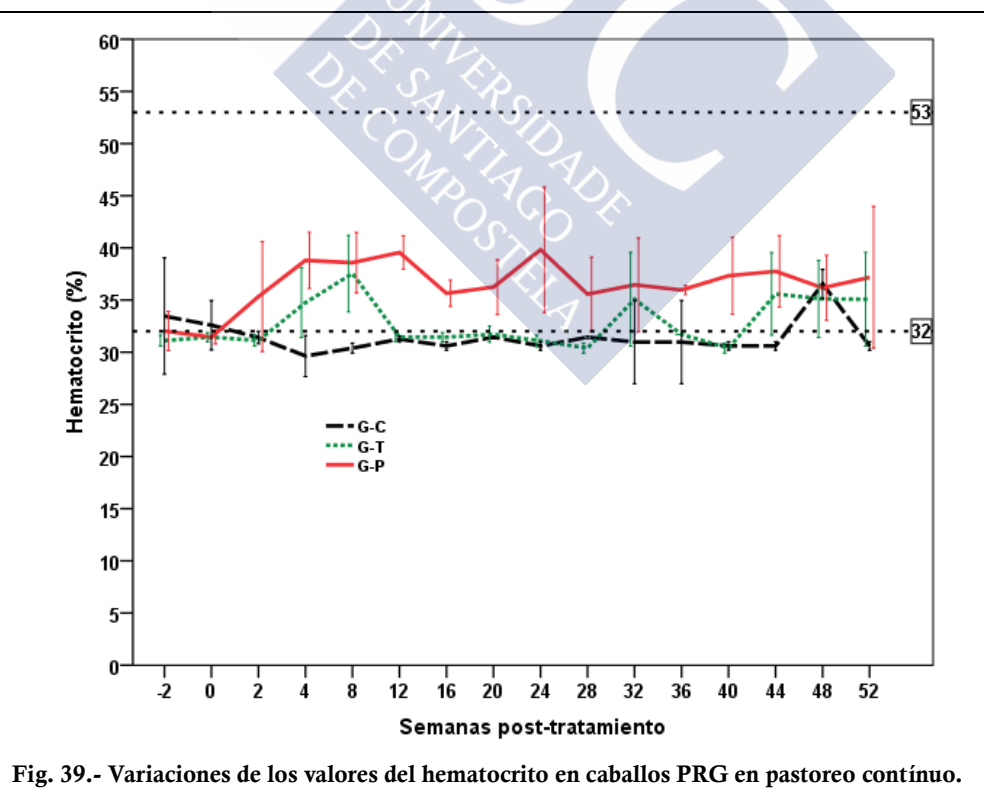
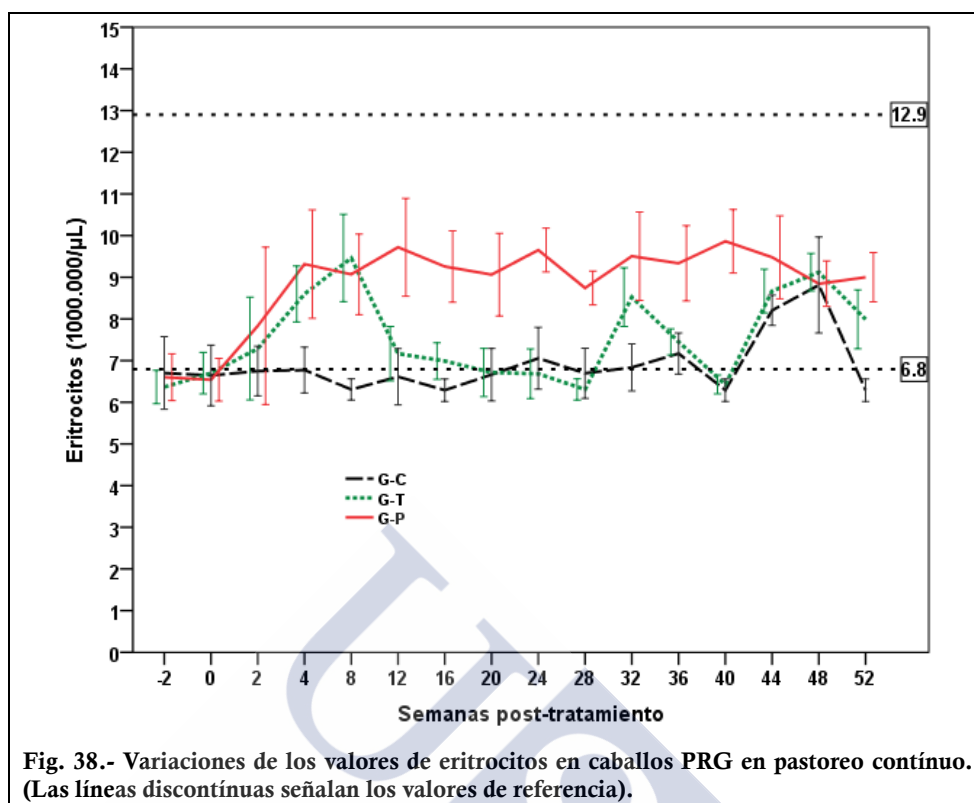
Teniendo en cuenta que en el G-P, el porcentaje de reducción de HPG (FERC) fue mayor de 90% hasta la 24ª spt (87%; IC 95% 85-91) (Tabla 10), el periodo de reaparición de huevos fue de 28 semanas. Los valores del CPF se mantuvieron por encima del 50% hasta la 24ª spt.

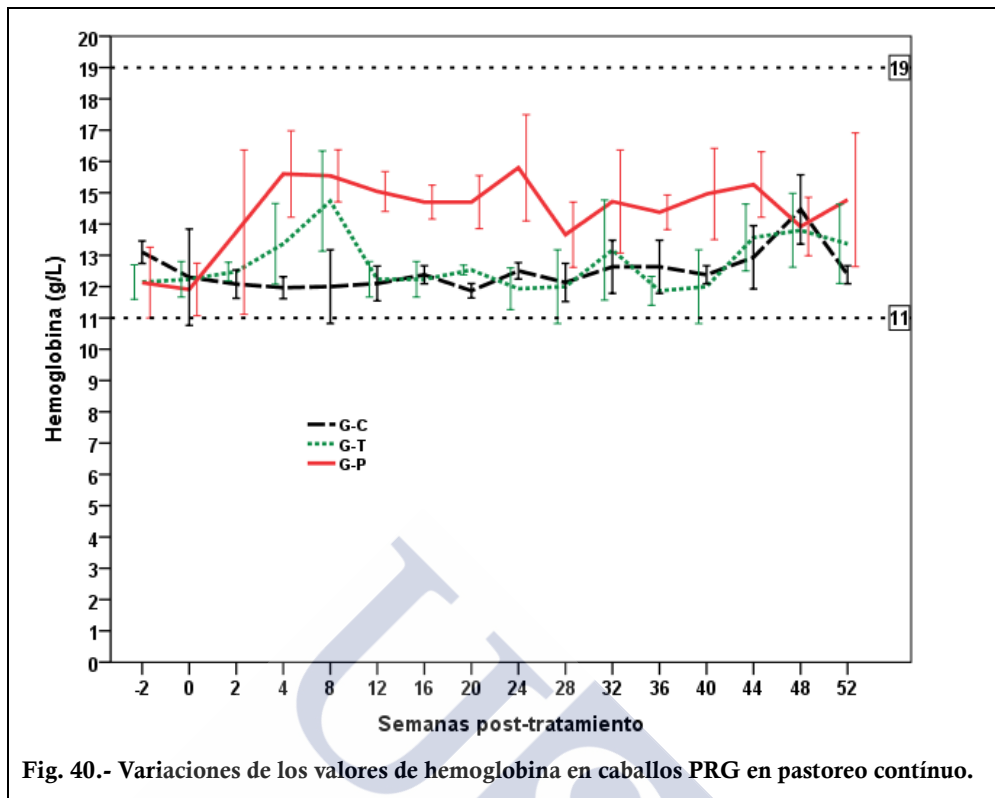
En los caballos del G-T, desde la 8ª spt se obtuvieron valores de FECR inferiores al 50%, por lo que el periodo de reaparición de huevos en heces resultó de 8 semanas (Tabla 10). Es importante destacar que todos los caballos de este grupo eliminaban huevos de estrongídeos a partir de la semana 12 post-tratamiento, y que la intensidad de eliminación fecal y el porcentaje de caballos positivos al final del estudio fue similar a los obtenidos en las yeguas del G-C (no tratadas), de modo que sería necesaria una nueva desparasitación.

Tabla 10.- Valores de FECR y CPF en caballos Pura Raza Galega (PRG) en pastoreo continuo.											
	G-P (n= 7)					G-T (n= 7)					
SPT	FECR	95% IC		CPF	95% IC		FECR	95% IC		CPF	95% IC
2	100			100			100			100	
4	100			100			100			100	
8	93	91 – 95		71	38 – 100		34	30 – 37		29	0 – 62
12	89	86 – 91		57	20 – 94		13	11 - 16		0	
16	88	86 – 91		29	0 – 62		12	9 – 14		0	
20	89	87 – 92		29	0 – 62		51	47 - 55		0	
24	87	85 – 91		57	20 – 94		36	32 – 40		0	
28	76	73 – 80		14	0 – 40		46	42 – 50		0	
32	74	71 – 77		14	0 – 40		7	5 – 9		0	
36	78	75 – 81		14	0 – 40		27	23 – 30		0	
40	73	70 – 77		14	0 – 40		23	19 – 26		0	
44	76	72 – 79		14	0 – 40		0			0	
48	80	77 – 83		14	0 – 40		0			0	
52	88	85 – 90		43	6 – 80		33	29 – 37		0	

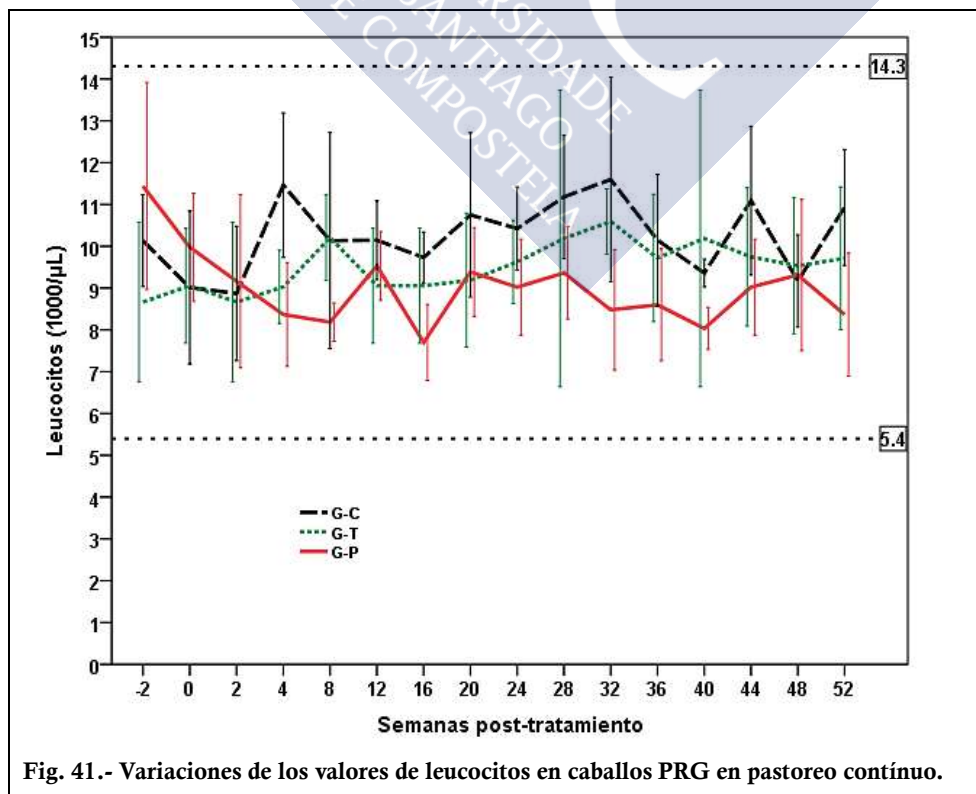
4.3.2. Parámetros hemáticos

En las figuras 38-40 se representan los parámetros de la serie roja. Los valores más bajos de eritrocitos y hematocrito se observaron en el G-C y G-T (alimentados con pellets sin esporas), en tanto que en el G-P se obtuvieron valores significativamente superiores ($F= 60,740$, $P= 0,001$ y $F= 43,600$, $P= 0,001$, respectivamente). Aunque los valores de hemoglobina fueron normales en todos los grupos, las cifras más elevadas se registraron en el G-P ($F= 48,265$, $P= 0,001$).





Respecto a la serie blanca (Fig. 41), únicamente se observaron diferencias significativas para los leucocitos, con los recuentos más altos en los equinos del G-C y del G-T ($F= 11,938$, $P= 0,001$).



Estos resultados coinciden en parte con ensayos previos en los que se demostró que la aplicación tópica de ivermectina a PRGs en silvopastoreo restauraba los valores normales de eritrocitos, hematocrito y leucocitos durante las primeras 12 semanas post-tratamiento; sin embargo a partir de este momento se volvieron a observar niveles bajos para los parámetros de la serie roja, y los de la serie blanca se elevaron (Francisco *et al.*, 2009a).

De acuerdo con la *American Association of Equine Practitioners*, los potros se deberían desparasitar a las 8-12 semanas de edad, y después repetir cada 3 meses hasta que alcancen un año (Nielsen *et al.*, 2013). La mera presencia de huevos de nematodos en las heces no debería sostener un tratamiento antihelmíntico; por otra parte, la reducción en la frecuencia de desparasitación se ha planteado como un objetivo para reducir la selección de resistencia antihelmíntica (AR). En esta misma línea, se han sugerido otros métodos que consisten en el tratamiento de los animales que superan un valor predeterminado de huevos en heces (*Terapia selectiva*), en tanto que el *Tratamiento Selectivo Orientado* (*Targeted Selective Treatment*, TST) se refiere a la administración de terapia cuando la salud o la productividad se reducen de forma significativa (Kenyon *et al.*, 2009; Kenyon y Jackson, 2012). En la presente investigación, después de la administración de ivermectina, los parámetros de la serie roja aumentaron de forma significativa hasta la 8ª spt (Figs. 38-40). En los caballos del G-T, desparasitados y alimentados con pellets sin esporas, estos parámetros disminuyeron por debajo de los valores normales, mientras que en el G-P permanecieron elevados hasta el final del estudio. Braga *et al.* (2009b) señalaron un aumento de la ganancia de peso en yeguas alimentadas con pellets que contenían micelio de *D. flagrans*.

Considerando los datos de los tres grupos, se establecieron correlaciones significativas y negativas entre los valores de HPG de strongílidos y los de glóbulos rojos (Coeficiente de Correlación, $CC = -0,469$, $P = 0,001$), hemoglobina ($CC = -0,460$, $P = 0,001$) y hematocrito ($CC = -0,404$, $P = 0,001$), lo que coincide con investigaciones previamente realizadas por Francisco *et al.* (2009) en condiciones similares. Por el contrario, la correlación fue positiva con los valores de leucocitos ($CC = 0,245$, $P = 0,001$). Estos datos revelan que la eliminación de huevos de strongílidos por encima de 400 HPG parece estar asociada a una carga parasitaria responsable de valores inferiores a los normales para los parámetros de la serie roja; además, se establecería que esta carga parasitaria supone un estímulo para el sistema inmunitario, que se traduce en el incremento de las poblaciones celulares de la serie blanca.

4.3.3. Efectos adversos

En las yeguas del G-P, que ingirieron pellets con esporas de hongos, no se observaron efectos secundarios en la función respiratoria, digestiva ni reproductiva; tampoco se registraron problemas cutáneos. Ninguna de estas yeguas rechazó la ingesta de los pellets. Se concluye que la alimentación de caballos con pellets portadores de esporas de hongos parasitcidas no supone ningún trastorno para su salud, además del efecto beneficioso demostrado en la prevención de infección de caballos en pastoreo continuo.

Una vez desglosadas las ventajas del empleo de hongos parasitcidas, es preciso profundizar en algunos aspectos relacionados con su utilización en programas de control integrado. En primer lugar, el desarrollo de posibles interferencias entre el antihelmíntico (ivermectina) sobre los hongos. No existen publicaciones al respecto, pero en ensayos preliminares realizados en el Laboratorio del grupo COPAR se demostró que *M. circumloides* y *D. flagrans* se desarrollaban de igual forma en placas Petri con o sin ivermectina (datos no publicados).

Otro punto importante hace referencia a la dosificación de las esporas. En investigaciones anteriores se indicó la necesidad de administrar cantidades elevadas de esporas de hongos para obtener buenos resultados, recomendándose dosis de 5×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* clamidosporas / Kg peso vivo para caballos y pequeños rumiantes (Larsen *et al.*, 1995; Epe *et al.*, 2008). Se han obtenido notables reducciones en las posibilidades de reinfección de équidos salvajes en un parque zoológico (Marcelle Natureza, Outeiro de Rei, Lugo, España) al proporcionarles una dosis de 2×10^6 de clamidosporas *D. flagrans* / Kg peso vivo, como lo demuestran los valores de FECR del 52-95% obtenidos en cebras, asnos y burros africanos que un año antes recibieron un tratamiento con ivermectina + praziquantel (Arias *et al.*, 2013). Con una dosis similar de conidios de *Monacrosporium thaumasium*, Araújo *et al.* (2004) consiguieron una reducción del 53,81% de la eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en terneras alimentadas con hongos dos veces por semana.

Se ha demostrado que *D. flagrans* se adapta a las tasas de huevos de ciatostominos presentes en la materia fecal, y se pueden alcanzar elevados porcentajes de reducción sin incrementar las dosis de clamidosporas (Paz-Silva *et al.*, 2011), lo que podría resultar muy ventajoso para obtener resultados satisfactorios con dosis inferiores a las mencionadas en diferentes investigaciones. En el presente estudio, las yeguas del G-P recibieron aproximadamente 2,5 Kg

de pellets al día, es decir, 5×10^6 esporas / yegua / día. Considerando un peso medio de 400 Kg, la dosis recibida sería de $1,25 \times 10^4$ esporas / Kg pv, y provocó una reducción en la eliminación de huevos de estongílidos de 2/3 en comparación con las yeguas que se alimentaron con pellets sin esporas. Otra ventaja del empleo de las esporas se observa en un incremento de 3 veces en el periodo de reaparición de huevos en heces (28 frente a 8 semanas post-tratamiento).

Un aspecto destacable reside en que las propiedades del concentrado alimenticio comercial se aseguran durante tres meses (período de consumo preferente recomendado por el fabricante), mientras que las esporas en pellets mantienen su actividad durante más de 6 meses (Arias *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2016).



Fig. 42.- En las heces de las yeguas del G-P se observaron clamidosporas de *D. flagrans* (izda.) y esporangios y esporas de *M. circinelloides* (dcha.).

El control de nematodos que afectan a caballos se basa en la desparasitación para eliminar la infección, y en aplicar medidas para evitar su reinfección. La administración de ivermectina *pour on* suprime la presencia de adultos de *P. equorum* y estongílidos. Los resultados obtenidos en el presente ensayo demuestran que las esporas de un hongo ovicida (*M. circinelloides*) y otro atrapanematodos (*D. flagrans*), incluídas durante la fabricación industrial de pellets, sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal de los caballos y alcanzan el exterior en las heces (Fig. 42). De los resultados observados en los equinos alimentados con estos pellets se infiere que en las heces, los hongos se desarrollan y disminuyen la viabilidad de diferentes estadios de nematodos estongílidos, consiguiéndose reducir el riesgo de infección, y por ello los recuentos fecales de huevos fueron significativamente inferiores a los de los caballos no recibieron pellets con esporas, e incluso al punto de corte (300 HPG) considerado.

**5.- ENSAYO III: Prevención de
infección por estrogílicos en
caballos en pastoreo
rotacional en una región de
clima oceánico**

5.1. INTRODUCCIÓN

Las zonas de clima oceánico, también conocido como marítimo o de la costa oeste marina, se caracterizan por temperaturas con veranos cálidos e inviernos moderadamente fríos y abundante precipitación a lo largo del año. Este clima afecta a regiones situadas a lo largo de las costas occidentales de latitudes medias de todos los continentes, y en Chile, Nueva Zelanda y Tasmania, favoreciendo que las especies forrajeras crezcan prácticamente todo el año (Francisco *et al.*, 2009).

Este tipo de clima favorece que los caballos se mantengan en prados durante varias horas al día incluso sin entrar en las cuadras durante largas temporadas. De esta manera viven y se alimentan de forma más natural, realizando ejercicio y socializando con otros caballos, lo que evita los llamados vicios de cuadra, que son comportamientos anormales propios de los caballos que se mantienen estabulados. Sin embargo, todas las indudables ventajas del mantenimiento de los caballos en pastoreo tienen el inconveniente de que este manejo incrementa el riesgo de adquirir infecciones parasitarias (Sanchís *et al.*, 2014).

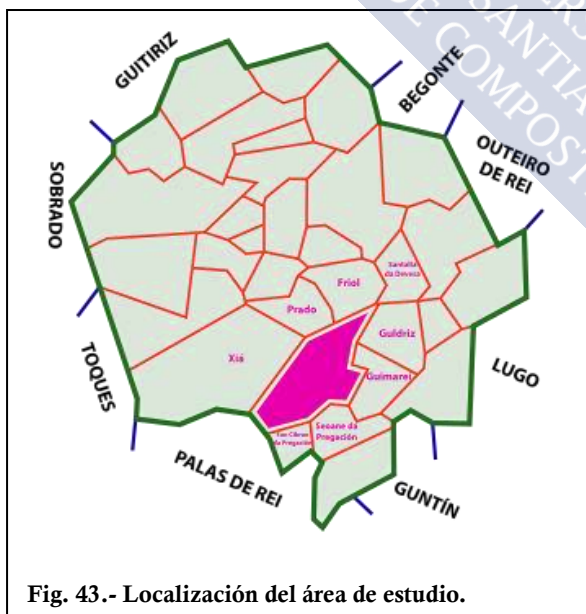
Como se ha descrito con anterioridad los nematodos gastro intestinales que infectan a los caballos desarrollan parte de su ciclo en el medio, los huevos eliminados con las heces desarrollan en su interior una L1, que abandona el huevo y en el suelo se transforma en L2 y L3 (Andersen *et al.*, 2013; Seyoum *et al.*, 2015) que suponen un riesgo para los caballos que las pueden ingerir junto con la hierba (Relf *et al.*, 2013; Sokół *et al.*, 2015). En zonas de clima oceánico se pueden llegar a alcanzar elevados recuentos durante prolongados periodos de tiempo (Kuzmina *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2007), y por ello se recomienda, entre otras prácticas, el pastoreo rotacional, que consiste en ir cambiando a los caballos de las parcelas cada cierto tiempo para evitar que se alimenten en prados altamente contaminados (Singer *et al.*, 2002).

Otras estrategias encaminadas a prevenir la infección de animales en pastoreo se fundamentan en el empleo de antagonistas naturales que se encuentran de forma habitual en el suelo, como ciertos hongos parasitoides que desenvuelven una actividad saprofita, alimentándose de materia orgánica en descomposición, salvo que detecten en sus proximidades la presencia de formas de propagación de algunos parásitos, como huevos, larvas, quistes... (Fernández *et al.*, 1999; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2012; Cazapal-Monteiro *et al.*, 2015).

Duddingtonia flagrans o *Monacrosporium thaumasium* (Fernández *et al.*, 1999; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2012; Tavela *et al.*, 2013) son hongos que se caracterizan por elaborar trampas en su micelio, en las que las larvas de los nematodos son capturadas, inmovilizadas y finalmente digeridas (Sagüés *et al.*, 2011; Zarrin *et al.*, 2015). Otras especies como *Mucor circinelloides* pueden adherirse a los huevos de ciertos parásitos, penetrar en su interior y destruirlo (Arroyo *et al.*, 2016), señalándose un efecto antagonista sobre los huevos de *Fasciola hepatica* y *Ascaris suum* en heces de terneras y lechones, respectivamente (Cortiñas *et al.*, 2015), de *Baylisascaris procyonis* eliminados por mapaches (Cazapal-Monteiro *et al.*, 2015) o de *Calicophoron daubneyi* (Arroyo *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en el capítulo II (*cfr.* 54), se consideró que en especial en las regiones del Norte de España, en los últimos años es muy frecuente mantener caballos en pastoreo rotacional, que reciben concentrado alimenticio 1 ó 2 veces / semana. Por ello, se diseñó un ensayo con el **objetivo de estimar el efecto beneficioso que supondría alimentar caballos en pastoreo rotacional, con concentrado elaborado con esporas de hongos parasiticidas, para prevenir su reinfección por nematodos gastrointestinales.**

5.2. MATERIAL y MÉTODOS



Este estudio se desarrolló en el lugar de Xul (Friol, Lugo, NO España, 42°58'49"N, 7°48'45"O) (Fig. 43).

Fig. 43.- Localización del área de estudio.

5.2.1. Producción de hongos saprofitos del suelo

Las esporas de los hongos *M. circinelloides* (ovicida) y *D. flagrans* (larvicida) se multiplicaron en el medio de cultivo líquido (COPFr), que se mantuvo 1,5-2 meses a temperatura ambiente, hasta que se obtuvo una concentración de $\geq 1 \cdot 10^8$ esporas / L (Arias *et al.*, 2013). Como ya se ha mencionado previamente, se trata de especies aisladas en el Laboratorio del grupo COPAR (Facultade de Veterinaria de Lugo, USC) a partir de heces de rumiantes y muestras de tierra de diferentes granjas en Galicia. Una vez obtenidas, las esporas se añadieron durante la fase de mezcla de la fabricación industrial de concentrado alimenticio comercial (*ProHorse Club*®), en la factoría de Nanta (Padrón, A Coruña); en concreto, por cada Kg se adicionaron 2×10^6 esporas de cada hongo (Arias *et al.*, 2015).

5.2.2. Diseño experimental

Se emplearon 22 Caballos de Deporte Español (CDE) en pastoreo durante todo el año. En consideración a ensayos previos en los que se tuvo en cuenta la *terapia selectiva* (Francisco *et al.*, 2009; Francisco *et al.*, 2012), al inicio del ensayo todos los caballos que eliminaban >300 huevos de estrongílicos por gramo de heces (HPG) recibieron un tratamiento tópico a base de ivermectina (1 mg / Kg pv, Noromectin 0.5%, Norbrook Laboratories, UK), y a continuación se dividieron de forma aleatoria en tres grupos:

- *G-CN: 6 CDE mantenidos en pastoreo continuo, que recibieron 2,5 Kg de pellets dos veces / semana (lunes y jueves).
- *G-RN: 8 CDE en pastoreo rotacional y alimentados con 2,5 Kg de pellets dos veces / semana (lunes y jueves).
- *G-RP: 8 CDE en pastoreo rotacional, a los que se proporcionaron 2,5 Kg pellets con *M. circinelloides* and *D. flagrans* dos veces por semana (Fig. 44).

Se dispuso de 9 prados vallados que en los cinco años anteriores habían sido utilizados para la alimentación de los caballos, y en los que nunca se habían aplicado medidas para reducir la presencia de formas parasitarias. Cada prado contaba con bebederos y comederos, de modo que los caballos disponían de agua *ad libitum*, y de heno de trigo y cebada cuando escaseaba el pasto (de diciembre a febrero).

Los caballos del grupo G-CN se mantuvieron todo el año en pastoreo continuo en un prado de 4,5 Ha durante el día, y se alojaban en boxes por la noche.

También durante un año, se emplearon un total de ocho prados arbolados y vallados, de aproximadamente 2,5 Ha, en una rotación de 4 prados que incluía un periodo de pastoreo de 6 semanas y otras 18 de descanso. Cuatro de estos prados se asignaron de forma aleatoria al grupo G-RN (denominados A-D) y otros cuatro al G-RP (identificados como 1-4). Cada mes y medio, los caballos del G-RN y del G-RP se trasladaron al siguiente prado, de modo que la rotación se completó en seis meses.



Fig. 44.- Administración de pellets con esporas de hongos parasitoides a los CDE del G-RP (pastoreo rotacional).

5.2.3. Diseño experimental

Los datos de temperatura (máxima, media y mínima), humedad relativa (%), días de helada, precipitación (L/m^2) y balance hídrico (L/m^2) se obtuvieron mensualmente de una estación climática automática (Corno do Boi, Friol, Lugo, NO España, 43°02'24" N, 7°53'24" O).

5.2.4. Pruebas coprológicas

Durante un año, se recogieron muestras de heces directamente del recto de cada caballo, de las cuales se analizaron 5 g mediante la técnica de flotación con solución saturada de NaCl ($\rho = 1,20 \text{ g / mL}$, con una sensibilidad de 30 HPG) (Francisco *et al.*, 2012).

La identificación de las especies de estrongílicos que afectaban a los caballos se realizó a través del análisis de coprocultivos. Antes de desparasitar los caballos, se tomaron 10 g de heces de cada uno y se mezclaron según el grupo al que pertenecían. A continuación los coprocultivos se incubaron durante 19 días a 22-25°C, y posteriormente se recogieron las L3 con la técnica de Baermann y se identificaron con un microscopio óptico (Leica DM2500; Leica Microsistemas, Barcelona, España) siguiendo claves morfológicas (Madeira de Carvalho *et al.*, 2008).

Para investigar la aparición de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en las heces de los caballos del G-RP, durante cinco días consecutivos se recogieron 5 g y se emulsionaron en 40 mL de agua, y a continuación se pasaron por una malla de 150 μm de diámetro de poro. El filtrado se recogió en dos tubos de 15 mL, que se centrifugaron a 1500 rpm / 5 min. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 2 mL de agua. Para observar las esporas de los hongos, se tomaron alícuotas de 50 μL y se colocaron entre un cubre y un porta, observándose al microscopio (10-20X).

5.2.5. Evaluación de la eficacia antiparasitaria

Se calcularon los valores de FECR (Reducción de los recuentos fecales de huevos, *Faecal Egg Count Reduction*) y el CPF (Reducción de Caballos positivos a la Flotación) (Francisco *et al.*, 2012):

$$\text{FECR (\%)} = [1 - (\text{Recuento fecal}_{\text{post-tratamiento}} / \text{Recuento fecal}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

$$\text{CPF (\%)} = [1 - (\text{n}^\circ \text{ caballos positivos}_{\text{post-tratamiento}} / \text{caballos positivos}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

De acuerdo con Nielsen *et al.* (2013), el periodo de reaparición de huevos en heces (*Egg Reappearance Period*, ERP) se estimó en función de la semana post-tratamiento en la que los valores del FECR disminuían por debajo del 90% (con un intervalo de confianza del 95%).

5.2.6. Análisis estadísticos

Los valores de FECR y CPF se expresaron como porcentajes con un IC 95%. La cinética de eliminación de huevos se representó como la media \pm 2 DE.

Debido a que la prueba de Kolmogorov-Smirnov señaló que la distribución de los valores de eliminación de strongídeos no se adaptaban a una distribución normal (Estadístico= 0,088, $P=0,001$), estos datos se analizaron con las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y “U” de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Se consideró que las diferencias eran significativas si $P < 0,05$; las semanas en las que existieron diferencias entre los grupos se indicaron en las figuras.

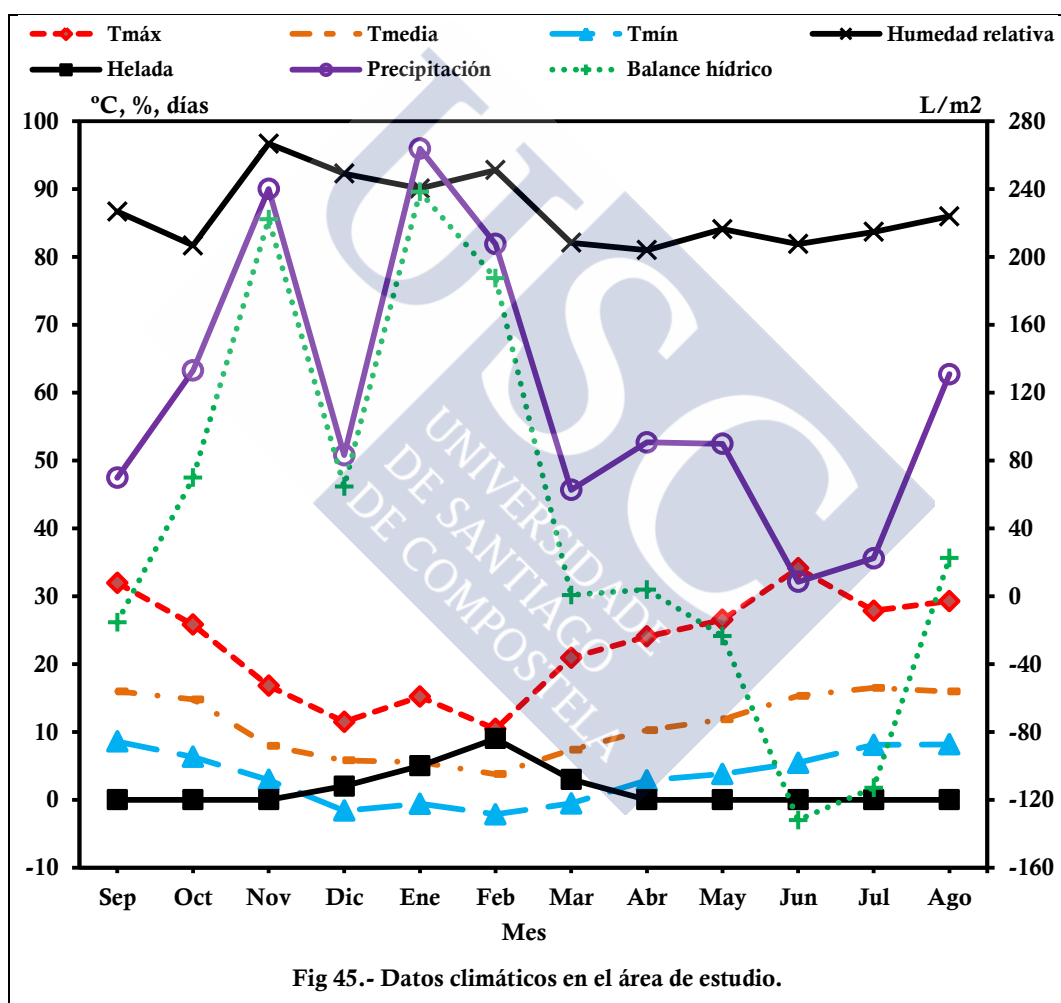
Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS (v. 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).



5.3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.3.1. Variaciones climáticas

Durante el periodo de un año de estudio, las temperaturas oscilaron entre -2°C (febrero) y 34°C (junio), registrándose días de helada entre diciembre y marzo (Fig. 45). Los valores máximos de precipitación se alcanzaron en enero, y los más bajos en junio, en tanto que los porcentajes de humedad relativa fueron superiores al 81% en todo el ensayo.



El balance hídrico resultó negativo en mayo-julio y en septiembre. Bajo estas condiciones, el desarrollo de los huevos de estrongídeos hasta los estadios infectivos (L3) se puede producir prácticamente durante todo el año en regiones de clima oceánico, puesto que este proceso requiere niveles de humedad superior al 15-20% y transcurre en 3 días a $25-35^{\circ}\text{C}$, 15-24 días a 1°C , o varias semanas a temperaturas por debajo de 10°C (Mfitilodze y Hutchinson, 1987). En

el área de estudio se registraron temperaturas superiores a 10°C durante todo el año a excepción del periodo entre diciembre y marzo, es decir, en el invierno, detectándose además días de helada. Se ha demostrado que los huevos de strongílidos no eclosionan por debajo de 6°C, pero permanecen viables (Smith, 2014). La observación de porcentajes de humedad relativa superiores al 81%, junto con elevados valores de precipitación excepto en el verano, proporcionan un balance hídrico negativo solo a finales de la primavera y principios del verano, y sugiere que en el medio existe un ambiente adecuado para el desarrollo y supervivencia de los estadios de vida libre de los strongílidos durante todo el año.

5.3.2. Especies de strongílidos identificadas

En las heces de los caballos se observaron solo huevos de strongílidos, y a partir de los correspondientes coprocultivos se identificaron larvas L3 de *Cyathostomum sensu latum* tipo A (63%), tipo C (14%) y tipo D (15%); *Gyalocephalus capitatus* (1%), *Triodontophorus serratus* (2%), *Poteriosthomum* spp. (2%), *Strongylus vulgaris* (2%) y *S. edentatus* (1%). Estos resultados coinciden con los obtenidos en yeguas PRG en el capítulo II de esta Memoria.

5.3.3. Eficacia de desparasitación

Al inicio del estudio, todos los caballos eliminaban más de 300 HPG de strongílidos, y por ello se desparasitaron con ivermectina *pour on*, y como se refleja en la Tabla 11, a las dos semanas los recuentos fecales disminuyeron en los tres grupos, obteniéndose unos valores del FECR de 100%, 96% y 99% para el G-CN, G-RN y G-RP, y del CPF de 100%, 63% y 88%. Debido a que los caballos en pastoreo se infectan por nematodos strongílidos al ingerir L3 con el pasto, es necesario administrar tratamientos antiparasitarios. Los resultados de la aplicación tópica de ivermectina coinciden con datos previamente obtenidos en caballos en la misma región (Francisco *et al.*, 2009; 2012), y con los presentados en el anterior capítulo de esta Memoria.

Pastoreo continuo				Pastoreo rotacional					
G-CN				G-RN			G-RP		
SPT	FECR (CI 95%)	CPF (CI 95%)	Pasto	FECR (CI 95%)	CPF (CI 95%)	Pasto	FECR (CI 95%)	CPF (CI 95%)	
2	100	100	A	96 (94, 98)	63 (29, 96)	1	99 (98, 100)	88 (65, 100)	
4	91 (87, 93)	50 (10, 90)		93 (91, 96)	50 (15, 85)		98 (96, 99)	75 (45, 100)	
6	80 (76, 84)	0		92 (89, 95)	50 (15, 85)		96 (94, 98)	75 (45, 100)	
8	54 (49, 59)	0		90 (87, 93)	38 (4, 71)	2	95 (93, 97)	63 (29, 96)	
10	51 (46, 56)	0	B	77 (72, 81)	38 (4, 71)		93 (91, 95)	63 (29, 96)	
12	17 (13, 20)	0	C	69 (65, 74)	38 (4, 71)		93 (91, 95)	50 (15, 85)	
14	15 (12, 19)	0		58 (53, 63)	0		91 (88, 93)	50 (15, 85)	
16	14 (11, 18)	0		39 (34, 44)	0	3	83 (79, 86)	38 (4, 71)	
20	3 (1, 4)	0	D	24 (20, 28)	0	4	74 (70, 77)	38 (4, 71)	
24	0	0		22 (18, 26)	0		63 (59, 67)	25 (0, 55)	
26	0	0		0	0		60 (56, 65)	0	
30	0	0	A	0	0	1	60 (56, 65)	0	
32	0	0	B	0	0	2	64 (60, 68)	0	
36	0	0		0	0		61 (57, 66)	0	
38	0	0		0	0		54 (50, 59)	0	
42	0	0	C	0	0	3	60 (56, 65)	0	
44	0	0	D	0	0	4	59 (55, 63)	0	
48	0	0		0	0		54 (50, 58)	0	

Tabla 11.- Valores del FECR y CPF en CDE en pastoreo.

El periodo de reaparición de huevos en heces (ERP) se situó en seis semanas post-tratamiento (mes y medio) en el G-CN, diez (dos meses y medio) en el G-RN y 16 (4 meses) en el G-RP, lo que indica que el mantenimiento de caballos en pastoreo rotacional prolonga este periodo en 4 semanas en comparación con los que se encuentran en pastoreo continuo, confirmando el efecto beneficioso del pastoreo rotacional (von Samson-Himmelstjerna, 2012). Si se observa rotación de pastos, y los caballos se alimentan además con concentrado con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, se consigue incrementar el ERP en 10 semanas en relación con el pastoreo continuo, y en 6 semanas con el pastoreo rotacional + concentrado sin esporas.

5.3.4. Dinámica de eliminación fecal de huevos de strongílidos

En los caballos en pastoreo continuo, que se alimentaron con pellets sin esporas (G-CN), los valores de HPG aumentaron gradualmente desde el primer mes post-tratamiento (pt) hasta el final del estudio (Fig. 46), alcanzándose cifras entre 306 (tercer mes pt) y 630 (12º mes pt), con unos valores de FECR del 51% y 0% durante este periodo. La mitad de los caballos (CPF= 50%) fueron positivos a la flotación a las cuatro semanas (un mes) post-tratamiento, y todos lo hicieron después de un mes y medio pt (seis semanas), como se muestra en la Tabla 11.

En el grupo G-RN, mantenido en pastoreo rotacional y alimentado con pellets sin esporas, también se observó un incremento progresivo de los valores de HPG, con cifras alrededor de 300 a los 5 meses pt (Fig. 46), y por encima de 600 al final del estudio. Los valores de FECR oscilaron entre 58% y 0% en este intervalo, mientras que la mitad de los caballos (CPF= 50%) ya eliminaban huevos un mes después del tratamiento (cuatro semanas pt) (Tabla 11), resultando todos positivos a la flotación a los 3 meses pt (14 semanas pt).

Finalmente, los valores de HPG en los caballos en pastoreo rotacional, que además recibieron pellets con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* dos veces / semana, aumentaron gradualmente en los primeros seis meses pt, con una media de 201 ± 133 , y entre el 7º y el 12º de 196-249 HPG (Fig. 46, Tabla 11). A partir del 4º mes, se observaron valores de FECR del 83-54%; la mitad de los caballos fueron positivos a los tres meses pt (12 semanas pt), y todos (CPF= 100%) desde los seis meses pt (26 semanas pt) (Tabla 11), y solo uno de los equinos excedió el punto de corte de 300 HPG, a partir del 9º mes pt.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de HPG entre los tres grupos de caballos ($\chi^2 = 59,138$, $P = 0,001$), que se establecieron entre el G-RP y el G-RN ($U = -6,003$, $P = 0,001$), y entre el G-RP y el G-CN ($U = -7,207$, $P = 0,001$).

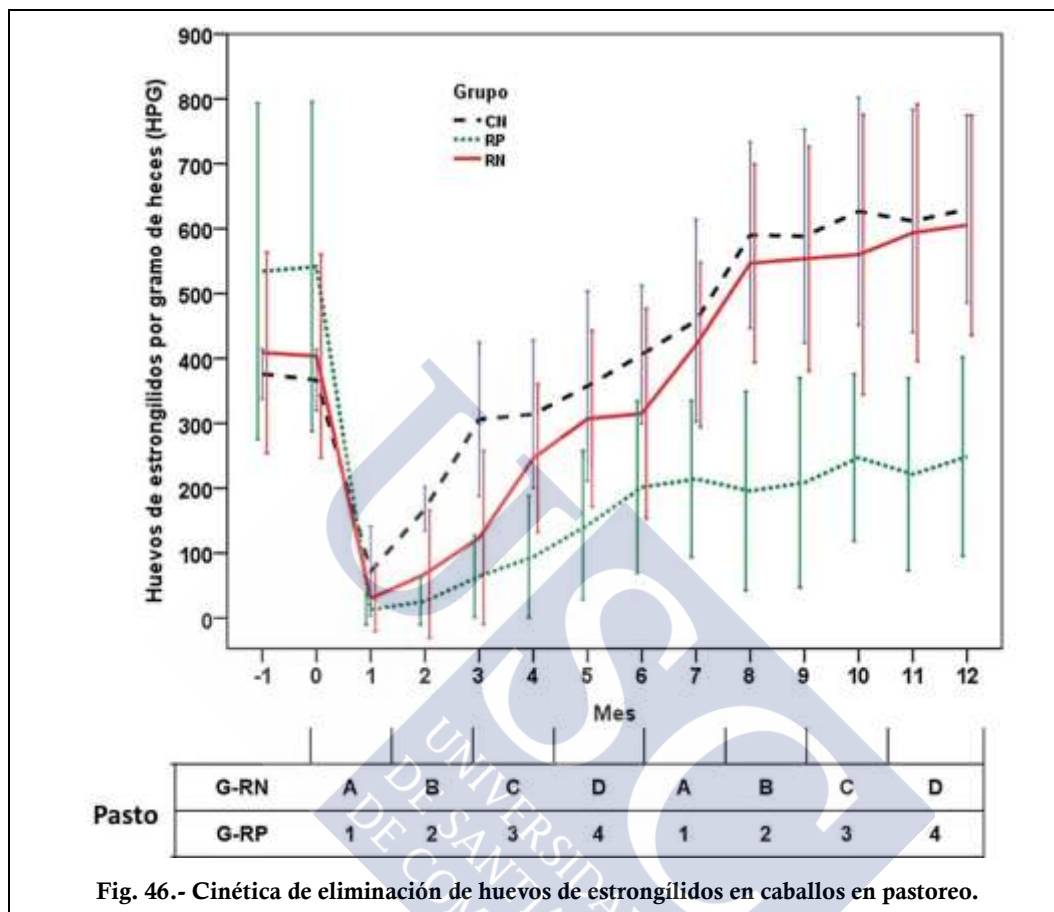


Fig. 46.- Cinética de eliminación de huevos de estrongídeos en caballos en pastoreo.

Aunque los huevos y larvas de estrongídeos pueden sobrevivir en las heces y en el suelo, incluso en periodos fríos (Kuzmina *et al.*, 2006), la presencia de larvas L3 se reduce con la duración del periodo de descanso del prado, estableciéndose que el riesgo de infección disminuiría de forma notable tras 3-6 meses (Johns *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2013). Sin embargo, el pastoreo rotacional podría retrasar la infección de los caballos, y éstos finalmente se reinfectarían y volverían a eliminar huevos en las heces, contaminando así el prado. En el presente ensayo, los caballos del G-RN alcanzaron valores de eliminación superiores a 300 HPG desde la semana 20 pt (5º mes pt), y por tanto precisarían de una nueva desparasitación, atendiendo al criterio de *Terapia selectiva* fijado al inicio.

Del análisis de los datos en los primeros 6 meses pt, resultan unos valores medios de eliminación de huevos de estrongídeos de 279 ± 151 en el G-CN, 214 ± 179 en el G-RN y 155 ± 192 en el G-RP ($\chi^2 = 13,526$, $P = 0,001$), demostrándose diferencias estadísticamente

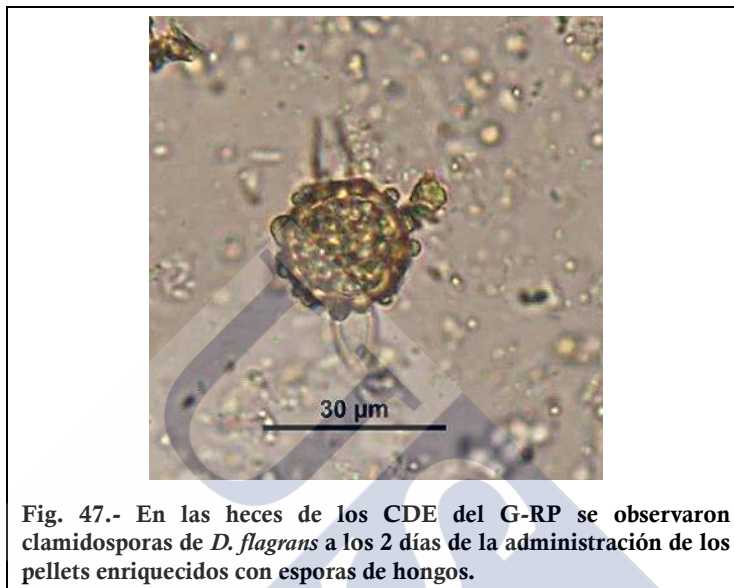
significativas entre el G-RP y G-CN ($U = -3,065$, $P = 0,001$), y entre el G-RP y el G-RN ($U = -2,104$, $P = 0,001$). Entre los meses 7 y 12 pt, los valores medios de HPG en el G-RP fueron 2,7 veces inferiores a los del G-CN ($U = -7,122$, $P = 0,001$), y 2,4 veces en relación con los del G-RN ($U = -7,439$, $P = 0,001$). De estos resultados se deduce que el periodo de pastoreo debería ser inferior a un mes y medio para reducir la contaminación de los prados (Colvin *et al.*, 2008), que conllevaría aumentar el número de pastos en rotación.

Evidentemente, no siempre es posible disponer de un número suficiente de pastos, ni de personal para manejar los animales y desplazarlos a praderas que pueden estar distantes entre sí, por lo que parece necesario reducir la viabilidad de los estadios de strongílidos en el medio, y en especial en las heces, dado que aunque los niveles de humedad y precipitación sean bajos, las L3 permanecen en la materia fecal (Reinemeyer, 1986). Se ha demostrado que la pulverización de clamidosporas de *D. flagrans* directamente sobre las heces de caballos en pastoreo en la región en estudio redujo la presencia de L3 de ciatostominos en un 94% (Paz-Silva *et al.*, 2011), y en 27-99% en equinos de Curitiba (Brasil), que cuenta también con clima oceánico (Buzatti *et al.*, 2015).

Para conseguir que las esporas del hongo atrapanematodos *D. flagrans* estuvieran presentes en las heces de caballos, Tavela *et al.* (2013) incorporaron micelio en pellets de alginato sódico fabricados artesanalmente y comprobaron que el resultado era exitoso. En el presente ensayo, se detectaron esporas de *M. circumloides* y *D. flagrans* por primera vez en todos los caballos del G-RP dos días después de la administración de los pellets (Fig. 47), lo que señala también la idoneidad de la adición de las esporas durante la fabricación industrial de pellets nutricionales, para asegurar su presencia en las heces de los equinos que los ingieren. Es importante destacar que ninguno de los caballos del G-RP rehusó ingerir los pellets con esporas de hongos, mostrando siempre normalidad en el apetito y en la función digestiva, así como en el comportamiento reproductivo y en la función respiratoria. No se observaron signos de alteraciones cutáneas en ningún momento. Estos resultados corroboran la inocuidad del empleo de las esporas en caballos, como ya se demostró también en el capítulo anterior.

El esquema de rotación aplicado en el presente estudio incluyó un periodo de pastoreo de un mes y medio, y otro de descanso del prado de cuatro meses y medio. Cuando los caballos del G-RN y G-RP finalizaron la rotación de pastos (a los primeros seis meses), se observaron dos niveles de eliminación de huevos. Mientras que en el G-RN se superaron los valores de 300 HPG, en el G-RP no se alcanzaron, obteniéndose unas cifras inferiores en un 28%. Una vez que

iniciaron de nuevo la rotación (7º mes pt) y entraron de nuevo en los pastos previamente utilizados, en el G-RN los valores de HPG aumentaron notablemente hasta registrarse cifras por encima de 600 HPG, en tanto que en el G-RP no se alcanzaron 300 HPG. Corning (2009) subrayó que se detectan huevos de ciatostominos en las heces de caballos a las 5-6 semanas de la ingestión de L3, y que este periodo se incrementa para los grandes estróngilos.



No existe hasta el momento información del efecto de *M. circinelloides* sobre los huevos de estróngilos, debido a que el desarrollo de la L1 en su interior puede transcurrir de forma más rápida que la acción del zigomicete, de modo que se producirá la salida de la L1 antes de que el hongo haya podido destruir el huevo o hacerlo inviable. A continuación, la L1 se transformará en L2 y posteriormente en L3, de ahí que se aconseje el empleo de hongos larvicidas como *D. flagrans* o *M. thaumasium* para el control de nematodos gastrointestinales estróngilos, porque como se ha expuesto en los **Antecedentes**, son capaces de elaborar hifas en las que se intercalan trampas o anillos con objeto de capturar los estadios larvarios. Pese a todo, se ha demostrado un notable efecto antagonista de *M. circinelloides* sobre huevos de trematodos (Cortiñas *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2017), ascáridos (Arias *et al.*, 2013; Hernández, 2014; Cazapal-Monteiro *et al.*, 2015) y tricúridos (Paz-Silva *et al.*, 2016), lo que induce a considerar que su utilización podría resultar complementaria a la acción que desarrolla *D. flagrans*. Aunque son necesarios más estudios, no parece nada desdeñable suponer que *M. circinelloides* ejerza sobre los huevos de estróngilos un efecto similar al que realiza sobre huevos de estructura más compleja como los de ascáridos, y que esta acción provoque la rotura de la cubierta y la consiguiente liberación de estadios con desarrollo incompleto, que no sobrevivirían en el medio.

En áreas de clima oceánico concurren las condiciones climáticas apropiadas para el desarrollo de especies pratenses prácticamente todo el año, de modo que con la rotación de pastos se puede asegurar la alimentación de los caballos durante un periodo similar. Los resultados del presente ensayo indican que la desparasitación de caballos con acceso a zonas de pasto supone una solución temporal, y que la reinfección de los equinos requerirá de nuevas administraciones de antiparasitarios. Si se mantienen en pastoreo rotacional, además del aspecto nutricional, se consigue disminuir el riesgo de infección por estrongídeos, aunque para lograr este objetivo sería necesario contemplar fases de pastoreo breves (probablemente en torno a 1-2 semanas, obviamente en función de la superficie) para evitar que los equinos se alimenten en entornos excesivamente contaminados por L3. Teniendo en cuenta que el número de prados para una rotación correcta podría resultar muy elevado, y por ello imposible de asumir, la suplementación con concentrados alimenticios dos veces / semana podría contribuir a la nutrición adecuada de los caballos. Si estos pellets han sido fabricados con una mezcla de esporas de hongos parasitoides con actividad complementaria (ovicida + larvicida), se conseguiría también prolongar el efecto beneficioso que proporciona la rotación de pastos para prevenir la infección de los equinos, y de forma totalmente inocua, sin causarles ningún efecto pernicioso.



6.- CONCLUSIONES



En el presente trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- La elaboración de trampas en el micelio de *Duddingtonia flagrans* no requiere la presencia de nematodos que se muevan, ni tampoco que estén vivos. Los trematodos adultos inducen la producción de anillos en el micelio y de un elevado número de clamidosporas.
- 2.- La adición de antígenos de excreción/secreción de helmintos al medio de cultivo estimula la morfogénesis de *D. flagrans* y aumenta la producción de clamidosporas. Con antígenos de trematodos se logran cantidades elevadas de clamidosporas, por lo que resultarían útiles para su producción a gran escala.
- 3.- Las esporas de los hongos parasitocidas *Mucor circinelloides* y *D. flagrans* incorporadas a pellets nutricionales elaborados de forma industrial resisten el tránsito a través del tracto gastrointestinal, y mantienen sus propiedades biológicas.
- 4.- La alimentación de caballos en pastoreo continuo con pellets nutricionales fabricados con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* reduce el riesgo de infección y permite disminuir la frecuencia del tratamiento antiparasitario.
- 5.- La presencia de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en la nutrición de caballos no provoca ningún efecto adverso en el aparato digestivo, respiratorio o reproductor.
- 6.- El pastoreo rotacional retrasa la reinfección por estrongílidos en los caballos, pero se necesitan periodos de pastoreo breves, y prolongados de reposo, para obtener resultados exitosos.
- 7.- La alimentación de caballos con pellets nutricionales enriquecidos con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* constituye una medida óptima para realizar estrategias de control integrado de parásitos.

7.- RESUMEN



El control de los principales parasitismos en caballos, que afectan al tracto gastrointestinal, precisa de medidas que disminuyan el riesgo de infección. A pesar de que un número importante de caballos se mantienen estabulados gran parte del día, la necesidad de realizar ejercicio o pasear, facilita su acceso a pastos, en los que existen formas infectivas que son ingeridas junto con el alimento. Por este motivo, además de disponer de antiparasitarios eficaces que supriman los parasitismos de los caballos, es necesario integrar en los programas de control medidas que reduzcan la presencia de las fases infectivas en el suelo.

Los inconvenientes que suponen la aparición de residuos de algunos antiparasitarios, junto con el efecto ecotóxico que ejercen ciertos metabolitos sobre organismos beneficiosos para el enriquecimiento de los suelos, llevan a considerar que hoy en día no caben muchas más opciones que intentar la implementación de mecanismos que ya funcionan de forma natural en el medio. Este es el razonamiento que ha impulsado la investigación en ciertos hongos antagonistas de las formas parasitarias en el suelo, especializados en tomar nutrientes, carbono y nitrógeno de huevos o larvas.

En el presente trabajo se evaluaron las posibilidades del control biológico de parasitismos gastrointestinales en caballos, para lo cual se diseñaron tres ensayos. Debido a que uno de los factores que pueden limitar el empleo de hongos parasitocidas es disponer de cantidades suficientes de sus formas de propagación más frecuentes (esporas, clamidosporas, conidios...), en el **PRIMER ENSAYO** se analizó en qué medida se podía estimular la morfogénesis del hongo larvicida *Duddingtonia flagrans*, para obtener cantidades elevadas de clamidosporas en placas Petri con medio de cultivo agar-trigo. Se visitaron diferentes mataderos y se recogieron ejemplares vivos de adultos de trematodos (*Fasciola hepatica* y *Calicophoron daubneyi*) y nematodos (*Parascaris* spp.); también se obtuvieron larvas L3 de *Anisakis* spp. de pescados en una lonja. Todas las formas parasitarias se incubaron en medio de cultivo líquido para obtener los correspondientes antígenos de excreción/secreción.

Se llevaron a cabo dos experimentos: en el primero se añadieron los antígenos a las placas previamente a la siembra con *D. flagrans*, y en el segundo se colocaron los parásitos (previa congelación). La morfogénesis más notable se obtuvo a los 10-13 días mediante la colocación de helmintos, en especial en presencia de adultos de los trematodos *F. hepatica* y *C. daubneyi*. La producción de clamidosporas también resultó significativamente superior con los helmintos adultos, observándose mejores resultados con los trematodos que con los nematodos. En investigaciones previas se ha indicado que la formación de trampas puede estar estimulada por

un déficit de nutrientes, en tanto que la producción de clamidosporas señalaría unas condiciones de crecimiento adversas para el hongo. Otros estudios apuntaron que la transición del estadio saprófito al predador depende de la presencia de nematodos vivos, que han de moverse para inducir la formación de trampas. Sin embargo, los resultados logrados en el presente ensayo muestran que algunos productos liberados por helmintos estimulan la formación de trampas, al igual que la presencia de formas adultas inertes. De igual modo, la observación de trampas tanto en las placas testigo como en aquellas que contenían ESP no concuerda con las afirmaciones de la necesidad de un déficit nutritivo para que ocurra este proceso, ni tampoco con el requerimiento de condiciones desfavorables de crecimiento. Al contrario, el mayor estímulo para la elaboración de trampas ocurrió al colocar fasciolas y paramphistómidos adultos, en lugar de nematodos.

Otro de los aspectos que concitan mayor interés en el control biológico con hongos parasitocidas, es el modo de distribución, de asegurar que estos antagonistas puedan desarrollar su actividad de forma idónea. La aplicación de estadios fúngicos ha de resultar sencilla, cómoda, realizable, para asegurar la máxima difusión. Teniendo en cuenta que los animales infectados eliminan formas parasitarias en las heces, hábitat en el que muchas de ellas experimentan cambios y finalmente permanecen ahí, o adquieren capacidad de movimiento y abandonan las heces, se consideró que podría resultar muy exitoso poner en contacto en la materia fecal a los parásitos y a sus antagonistas. Para lograr tal objetivo, la vía oral parece la más adecuada, y los primeros estudios consistieron en administrar soluciones acuosas de esporas. Sin embargo, aunque proporciona buenos resultados, supone una tarea añadida para cuidadores/propietarios de animales, lo que impulsó a desarrollar el **SEGUNDO ENSAYO** cuyo propósito principal fue evaluar la utilidad de fabricar, de forma industrial, pellets nutricionales con esporas de hongos parasitocidas. Además, para conseguir un rango de actuación más amplio, se utilizaron esporas de *Mucor circinelloides* (ovicida) y *D. flagrans* (larvicida), que se obtuvieron en el medio de cultivo líquido COPFr, compuesto por agua, cereales y una proteína recombinante de *F. hepatica* (FhrAPS), en base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior.

Durante 12 meses, se tomaron muestras de heces y de sangre de tres grupos de yeguas autóctonas PRG (Pura Raza Galega), el G-T constituido por yeguas desparasitadas con 1 mg de ivermectina *pour on* / Kg pv y alimentadas diariamente con pellets sin esporas de hongos; el G-C, formado por yeguas que se mantuvieron sin desparasitar, como testigos, a las que se les proporcionaron diariamente pellets sin esporas de hongos; y el G-P, integrado por yeguas

desparasitadas con 1 mg de ivermectina *pour on* / Kg pv, que además recibieron diariamente pellets con esporas de hongos, que se fabricaron en una factoría cercana a Lugo (NO España).

Cada grupo se mantuvo en tres praderas cercadas de una superficie aproximada de tres hectáreas, que contaban con bebederos, comederos y refugios de madera para guarecerse. Los caballos dispusieron de agua *ad libitum*, y recibieron cada día 2,5 Kg de concentrado en pellets. En las épocas de escasez de pasto (diciembre-febrero y julio-agosto) se suplementaron con heno.

Las heces se analizaron mediante flotación, y las muestras de sangre se procesaron con un analizador hemático para determinar las variaciones de las series roja y blanca.

Con el propósito de descartar la aparición de efectos adversos tras la adición de las esporas a los pellets, se prestó atención a la posible detección de olor desagradable, consistencia o sabor anormal, que provocasen que las yeguas del G-P rehusasen ingerir el alimento concentrado.

Para asegurar que los pellets con esporas no provocaban alteraciones en las yeguas del G-P, se comprobó que tenían apetito normal, que no estornudaban o presentaban constipación, diarrea o deshidratación. Se prestó atención a la función respiratoria observando posibles signos como tos, descarga nasal, temperatura o respiración anormales, disnea de esfuerzo después de realizar ejercicio. También se exploró la funcionalidad reproductora, en base a que las yeguas presentasen ciclos estrales durante todo el estudio. Finalmente, el estudio se completó con el examen de la piel.

Al comienzo del estudio todos los equinos excretaban huevos de *strongylids*, y el 14-29% huevos de *P. equorum*. Con la administración de ivermectina se obtuvo un 100% de eficacia frente a los nematodos gastrointestinales. En los caballos alimentados con pellets con esporas, la eliminación de huevos alcanzó valores inferiores a 300 HPG (huevos por gramo de heces), y los valores hemáticos mostraron valores normales durante todo el estudio. En los otros dos grupos se obtuvieron eliminaciones máximas cercanas a 700 HPG, y los recuentos de eritrocitos y el hematocrito se mantuvieron por debajo de los niveles fisiológicos. Finalmente, no se observaron efectos adversos en la función respiratoria, digestiva ni reproductiva; tampoco se registraron problemas cutáneos, y ninguna de estas yeguas rechazó la ingesta de los pellets.

En el **TERCER ENSAYO** se administraron pellets nutricionales con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* a un grupo de Caballos de Deporte Español (CDE) en pastoreo rotacional (G-RP), manteniéndose otro con pellets sin esporas como testigo (G-RN); además, se dispuso de un tercer grupo de CDE en pastoreo continuo (G-CN). Todos los equinos se desparasitaron por vía tópica al principio del estudio, y recibieron pellets dos veces/semana durante 12 meses.

Se emplearon 9 prados vallados que en los cinco años anteriores habían sido utilizados para la alimentación de los caballos. Cada prado contaba con bebederos y comederos, de modo que los caballos disponían de agua *ad libitum*, y de heno de trigo y cebada cuando escaseaba el pasto (de diciembre a febrero).

El efecto de la estrategia antiparasitaria se midió con el análisis de las variaciones de los recuentos fecales de huevos. El tratamiento con ivermectina proporcionó una eficacia del 100%, 96% y 99% para el G-CN, G-RN y G-RP. En los caballos del G-CN, la eliminación de huevos de estrongílicos aumentó gradualmente desde el primer mes post-tratamiento (pt) hasta el final del estudio. En el G-RN, los valores resultaron de 300 HPG a los 5 meses pt, y >600 al final del estudio. Finalmente, en el G-RP se obtuvieron unos valores medios de 201 ± 133 HPG en los primeros seis meses, y de 196-249 HPG entre el 7º mes y el 12º.

El control eficiente de estrongílicos de caballos precisa de estrategias para reducir la presencia de larvas infectivas en los prados, que haría posible disminuir la frecuencia de tratamientos antihelmínticos. En regiones de clima oceánico, el pastoreo rotacional contribuye a prevenir la infección por estrongílicos, pero la prolongada persistencia de estadios viables en el suelo hace necesarias medidas adicionales, a menos que se acorte el perio de pastoreo (<6 semanas). Con la suplementación dos veces a la semana con pellets elaborados de forma industrial con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* se asegura su presencia en las ehces, limitando de esto el desarrollo de los estadios de estrongílicos en el suelo y de este modo el riesgo de infección en los animales en pastoreo.

De los datos obtenidos en los tres ensayos se concluye que no es necesaria la presencia de nematodos que se muevan, ni tampoco que estén vivos, para que se formen trampas en el micelio de *D. flagrans*. Antes bien, la adición de antígenos de excreción/secreción de helmintos al medio de cultivo estimula la morfogénesis de *D. flagrans*, que se traduce en un mayor número de clamidosporas. Este fenómeno se reveló especialmente al añadir antígenos de trematodos, que resultarían útiles para la producción de formas de propagación a gran escala.

También se infiere de los resultados presentados la capacidad de las esporas de los hongos parasitoides *Mucor circinelloides* y *D. flagrans* para sobrevivir al tránsito por el tracto gastrointestinal, cuando son incorporadas a pellets nutricionales elaborados de forma industrial. Por ello, se aconseja la alimentación de caballos en pastoreo con estos pellets, para disminuir el riesgo de infección de los equinos, y asimismo limitar la frecuencia de tratamientos antiparasitarios. Esta estrategia no resulta lesiva para la salud de los caballos, y contribuiría además al diseño de programas para el control integrado de formas parasitarias.



8.- BIBLIOGRAFÍA



- Anan'ko GG, Teplyakova TV (2011) Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. Microbiology 80: 188-193.
- Andersen UV, Howe DK, Olsen SN, Nielsen MK (2013) Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. Vet Parasitol 192: 1-9.
- Araújo JV (1998) Predacious activity of *Arthrobotrys* spp. isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. Braz J Vet Res Anim Sci 1: 9-11.
- Araújo JV, Guimarães MP, Campos AK, Sá NC, Sarti P, Assis RCL (2004) Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. Ciência Rural, Santa Maria-RS. 34: 457-463.
- Araujo JM, de Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Ferreira SR (2009) Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. Vet Parasitol 166: 86-89.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO (2010) In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. Parasitol Res 107: 103-108.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Tavela Ade O, Ferreira SR, Soares FE, Carvalho GR (2012) Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. Braz J Vet Parasitol 21: 157-160.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. Vet Rec 168: 408.
- Arias MS, Piñeiro P, Hillyer GV, Francisco I, Cazapal-Monteiro CF, Suárez JL, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012a) Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. Parasitol Res 110: 1001-1007.
- Arias M, Suárez J, Cortiñas FJ, Francisco I, Suárez JL, Romasanta A, Cazapal-Monteiro C, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012b) Restoration of fungal biota in the soil is essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 341-358.

- Arias MS, Cazapal-Monteiro C, Valderrábano E, Miguélez S, Rois JL, López-Arellano ME, Madeira de Carvalho L, Mendoza de Gives P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012) A Preliminary Study of the Biological Control of Strongyles Affecting Equids in a Zoological Park. *J Eq Vet Sci* 33: 1115-1120.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Suárez J, Miguélez S, Francisco I, Arroyo FL, Suárez JL, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2013) Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int* 567876. doi: 10.1155/2013/567876.
- Arias MS, Sanchís J, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Miguélez S, Ortega E, Bonilla R, Miquel Femenias S, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2014) Exposición a parásitos hepáticos en caballos en pastoreo. XV Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 5-6 diciembre.
- Arias MS, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Suárez J, Francisco I, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A (2015) Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. *J Sci Technol Environ* 5: 1-16.
- Arroyo FL, Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Suárez J, Miguélez S, Romasanta A, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2016) The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biol Control* 92: 38-44.
- Arroyo FL, Hernández JÁ, Cazapal-Monteiro CF, Pedreira J, Sanchís J, Romasanta Á, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MA (2017) Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *J Parasitol*. doi: 10.1645/16-76.
- Badii MH, Abreu JL (2006) Control biológico una forma sustentable de control de plagas. (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.
- Bairden K, Davies HS, Gibson NR, Hood AJ, Parker LD (2006) Efficacy of moxidectin 2 per cent oral gel against cyathostomins, particularly third-stage inhibited larvae, in horses. *Vet Rec* 158: 766-767.
- Balan J, Lechevalier HA (1972) The predaceous fungus *Arthrobotrys dactyloides*: induction of trap formation. *Mycologia* 64: 919-922.
- Barron GL (1977) The Nematode-destroying Fungi. Canadian Biological Publications Ltd, Guelph, Ontario, Canada 140 pp.

- Baudena MA, Chapman MR, Larsen M, Klei TR (2000) Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet Parasitol* 89: 219-230.
- Bird J, Herd RP (1995) In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Vet Parasitol* 56: 181-187.
- Blaszkowska J, Kurnatowski P, Wojcik A, Goralska K, Szwabe K (2014) In vitro evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol* 199: 165-171.
- Boguś MI, Czygier M, Kddra E, Samborski J (2005) In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Exp Parasitol* 109: 115-123.
- Bohórquez A, Meana A, Pato NF, Luzón M (2014) Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. *Vet Parasitol* 204: 396-401.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 356-358.
- Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Campos AK (2009a) In vitro evaluation of nematode predacious fungus *Duddingtonia fragrans* on cyathostomes infective larvae of equines (Nematoda: Cyathostominae). *Rev Bras Parasitol Vet Suppl* 1: 83-85.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Tavela AO, Campos AK, Carvalho GR (2009b) Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 163: 335-340.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Campos AK, Tavela AO, Ferreira SR, Frassy LN, Alves CD (2010) *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *J Helminthol* 84: 21-25.
- Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JV, Pinto OS (2011) Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *J Helminthol* 85: 7-11.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Tavela AO, Araújo JM, Carvalho RO, Fernandes FM, Queiroz JH (2012) Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and

- Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. *Biocontrol Sci Techn.* 22: 685-696.
- Brunori A, Buischio A, Cassinis A (1985) *Introduzione allo studio dei funghi*. Casa Editrice "Il Libro" – Italia, 222 pp.
- Burk SV (2013) Detection of antibodies against *Parascaris equorum* excretory-secretory antigens. *Theses and Dissertations – Animal and Food Sciences*. Paper 21. http://uknowledge.uky.edu/animalsci_std/21
- Buzatti A, De Paula Santos C, Fernandes MA, Yoshitani UY, Sprenger LK, Dos Santos CD, Molento MB (2015) *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp Parasitol* 159: 1-4.
- Canever RJ, Braga PR, Boeckh A, Grycajuck M, Bier D, Molento MB (2013) Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet Parasitol* 194, 35-39.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Alves CD (2010) Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol* 169: 123-127.
- Casillas-Aguilar JA, Mendoza de Gives P, López-Arellano ME, Hernández L, 2008. Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Animal biodiversity and emerging diseases*. *Ann NY Acad Sci* 1149: 161-163.
- Cate JR (1994) *Integrated Pest Management: The Past of a Paradigm*. National Audubon Society: 40 págs.
- Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Arias MS, Suárez JL, Miguélez S, Francisco I, Lago P, Rodríguez MI, Cortiñas FJ, Romasanta A (2014) Horse Rearing Conditions, Health Status and Risk of Sensitization to Gastrointestinal Parasites. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade Fernández R (eds.) *Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 73-92.
- Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Romasanta Á, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. *Parasitol Res* 114: 2443-2450.
- Cazapal-Monteiro CF (2016) *Posibilidades de control de helmintozoonosis parasitarias en Galicia*. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Chandler KJ, Love S (2002) Patterns of equine faecal egg counts following spring dosing with either fenbendazole or moxidectin. *Vet Rec* 151: 269-270.

- Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Hoglund J, Larsen M, Zahari WM (2002) Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. Vet Res 33: 685-696.
- Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA (2002) Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. Vet Parasitol 103: 251-257.
- Ciarmela ML, Arambarri AM, Minvielle MC (2012) Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de *Toxocara canis*. Editorial: EAE Editorial Academia Espanola, United States.
- Cleale RM, Edmonds JD, Paul AJ, Reinemeyer CR, Chapman MR, Clem R, Meccoli RA, Tolliver SC, Amodie DM (2006) A multicenter evaluation of the effectiveness of Equest Gel (2% moxidectin) against parasites infecting equids. Vet Parasitol 137: 119-129.
- Coles GC (2002) Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. Vet Rec 151: 165-169.
- Coles G, Rhodes A (2005) Control of nematode infections in horses. Vet Rec 157: 123.
- Colvin AF, Walkden-Brown SW, Knox MR, Scott JM (2008) Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. Vet Parasitol 153: 108-120.
- Comer KC, Hillyer MH, Coles GC (2006) Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. Vet Rec 158: 596-598.
- Corning S (2009) Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. Parasit Vectors 2 Suppl 2: S1.
- Cortiñas FJ, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Suárez J, López de Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A, Arias MS (2015) Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. Biocontrol Sci Techn 25: 1443-1452.
- Cortiñas FJ (2016) Desarrollo de ganadería ecológica e inclusión social. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Cutolo AA, Santos AT, Allegretti SM (2011) Field study on the efficacy of an oral 2% ivermectin formulation in horses. Rev Bras Parasitol Vet 20: 171-175.
- Da Silva ME, de Araújo JV, Braga FR, Borges LA, Soares FE, Lima Wdos S, Guimarães MP (2013) Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. BMC Res Notes 6: 340.
- De Almeida GL, Santurio JM, Filho JO, Zanette RA, Camillo G, Flores AG, Da Silva JH, De La Rue ML (2012) Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. Parasitol Res 110: 657-662

- De Carvalho LM, Braga FR, Domingues RR, Araujo JM, Lelis RT, de Paula AT, da Silveira WF, de Araújo JV (2014) Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. J Basic Microbiol 54 Suppl 1: S109-S114.
- De Mello IN, Braga FR, Monteiro TS, Freitas LG, Araujo JM, Soares FE, Araújo JV (2014) Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. Rev Iberoam Micol 31: 114-118.
- Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Puppim AC, Perboni WR (2013) *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. Parasitol Res 112: 2131-2136.
- Dobson RJ, Besier RB, Barnes EH, Love SCJ, Visard A, Bell LF, Le Jambre LF (2001) Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance. Austr Vet J 79: 756-761.
- Duddington CL (1951) Further records of predacious fungi. I. Transactions of the British Mycological Society 33: 209-214.
- Duque De Araújo Munhoz AM (2014) Principales parasitosis gástricas en équidos de Portugal. Tesis Doctoral. Faculdade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Ehizibolo DO, Kamani J, Ehizibolo PO, Egbu KO, Dogo GI, Salami-Shinaba JO (2012). Prevalence and significance of parasites of horses in some States of northern Nigeria. J Equine Sci 23: 1-4.
- Elsener J, Villeneuve A (2009) Comparative long-term efficacy of ivermectin and moxidectin over winter in Canadian horses treated at removal from pastures for winter housing. Can Vet J 50: 486-490.
- Epe C, Coati N, Schnieder T (2004) Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. Dtsch Tierarztl Wochenschr 111: 243-247.
- Epe C, Holst C, Koopmann R, Schieder T, Larsen M, von Samson-Himmelstjerna G (2008) Investigation on the influence of nematophagous fungi as feed additive on nematode infection risk of sheep and goats on pasture. Agric Forest Res 3: 191-152.
- Esteves I, Peteira B, Atkins SD, Magan N, Kerry B (2009) Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. Mycol Res 113: 867-876.
- Fan CK, Su KE (2004). Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Int 53: 263-271.

- Feder WA (1960) Osmotic destruction of plant parasitic and saprophytic nematodes by the addition of sugars to the soil. *PI Dis Repr* 44: 883-885.
- Feder WA, Everard C, Wootton L (1963) Sensitivity of several species of the nematophagous fungus *Dactylella* to a morphogenic substance derived from free-living nematodes. *Nematologica* 9: 49-54.
- Federica SM, Alberto FL, Emilia IL, Carina MF, Alfredo SC (2013) Optimization of production of chlamydospores of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in solid culture media. *Parasitol Res* 112: 1047-1051.
- FEEDAP. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of the micro-organism preparation of *Duddingtonia flagrans*, for use as a feed additive for calves in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Question No EFSA-Q-2004-115). Adopted on 7 of March 2006. *The EFSA Journal* (2006) 334: 1-8.
- Fernández AS, Henningsen E, Larsen M, Nansen P, Grønvold J, Søndergaard J (1999) A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Vet J* 31: 488-491.
- Fernández AS, Larsen M, Wolstrup J, Grønvold J, Nansen P, Bjørn H (1999) Growth rate and trapping efficacy of nematode trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitol Res* 85: 661-668.
- Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, Frassy LN, Freitas LG (2010) Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Trop Anim Health Prod* 43: 639-642.
- Fikru R, Reta D, Teshale S, Bizunesh M (2005) Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western highlands of Oromia, Ethiopia. *Bull An Health Prod Afr* 53: 161-166.
- Flament Simon S (2015) Prevención de zoonosis parasitarias mediante hongos telúricos. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez I (2010) Epidemiología de los principales parasitismos del caballo en Galicia. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez R (2013) Utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de infecciones parasitarias en équidos. Tesis Doctoral, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco I, Arias M, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Sánchez JA, Uriarte J, Suárez JL, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Díez-Baños P, Paz-Silva A (2009a) Silvopastoralism and

- autochthonous equine livestock: analysis of the infection by endoparasites. *Vet Parasitol* 164: 357-362.
- Francisco I, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Arias M, Mula P, Suárez JL, Morondo P, Díez-Baños P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2009b) Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. *Equine Vet J* 41: 713-715.
- Francisco I, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Suárez J, Cazapal C, Suárez JL, Arias MS, Morondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. *J Equine Vet Sci* 31: 530-535.
- Francisco R, Paz-Silva A, Francisco I, Cortiñas FJ, Miguélez S, Suárez J, Sánchez-Andrade R (2012) Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. *J Eq Vet Sci* 32: 274-280.
- Fritzen B, Rohn K, Schnieder T, Von Samson-Himmelstjerna G (2010) Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Vet J* 42: 79-83.
- Getachew M, Trawford A, Feseha G, Reid SWJ (2010) Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 42: 27-33.
- Geurden T, Van Doorn D, Claerebout E, Kooyman F, De Keersmaecker S, Vercruysse J, Besognet B, Vanimisetti B, Di Regalbono AF, Beraldo P, Di Cesare A, Traversa D (2014) Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Vet Parasitol* 204: 291-296.
- Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA (2008) Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malays J Microbiol* 4: 35-41.
- Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, Rawat H, Friberg L (1996) Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J Helminthol* 70: 291-297.
- Gürler AT, Bölükbaş CS, Açıci M, Umur S (2010) Check list of the helminths of equines in Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* 34: 40-44.
- Gutiérrez-Delgado EM, Treviño-González JL, Montemayor-Alatorre A, Ceceñas-Falcón LA, Ruiz-Holguín E, Andrade-Vázquez CJ, Lara-Medrano R, Ramos-Jiménez J (2016) Chronic rhino-orbito-cerebral mucormycosis: A case report and review of the literature. *Ann Med Surg (Lond)* 6: 87-91.

- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.
- Hernández Malagón JÁ (2014). Posibilidades de control de helmintozoonosis por ascáridos mediante el uso de hongos telúricos. Memoria de Licenciatura, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Hernández JÁ, Arroyo FL, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Romasanta Á, López-Arellano ME, Pedreira J, de Carvalho LM, Sánchez-Andrade R, Arias MS, de Gives PM, Paz-Silva A (2016) Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* 229: 37-44.
- Hertzberg H, Schwarzwald CC, Grimm F, Frey CF, Gottstein B, Gerber V (2014) Helminth control in the adult horse: the need for a re-orientation. *Schweiz Arch Tierheilkd* 156: 61-70.
- Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, Miethe N, Zessin KH, Clausen PH (2011) Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 108: 1083-1091.
- Johns H, Johnson K, Turner L (2004) Rotational grazing. University of Kentucky Coop. Ext. Serv. ID-143, Lexington.
- Hodgkinson JE, Clark HJ, Kaplan RM, Lake SL, Matthews JB (2008) The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int J Parasitol* 38: 1149-1160.
- Irving F, Kerry BR (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica* 32: 474-485.
- Jackson F, Coop RL (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: S95-S107.
- Jatala P (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 453-489.
- Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481.
- Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruysse J, Jackson F (2009) The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 164: 3-11.
- Kenyon F, Jackson F (2012) Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet Parasitol* 186: 10-17.

- Kerry BR (1987). Biological control. En: Principles and practice of nematode control in crops. Academia Press Australia, Chapter 7, pp. 233-263.
- Khan MR, Zaidi B, Haque Z (2012) Nematicides control rice root-knot, caused by *Meloidogyne graminicola*. *Phytopathol Mediterr* 51: 298-306.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS (2008) Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 753-763.
- Kumar N, Rao TKS, Varghese A, Rathor VS (2013) Internal parasite management in grazing livestock. *J Parasit Dis* 37: 151-157.
- Kuzmina TA, Kuzmin YI, Kharchenko VA (2006) Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Vet Parasitol* 141: 264-272.
- Kuzmina TA, Kharchenko VO (2008) Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Vet Parasitol* 154: 277-288.
- Kwa MS, Veenstra JG, Van Dijk M, Roos MH (1995) Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246: 500-510.
- Larriba E, Martín-Nieto J, López-Llorca LV (2012) Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. *Can J Microbiol* 58: 815-827.
- Larsen M, Nansen P, Henriksen SA, Wolstrup J, Grønvold J, Zorn A, Wedø E (1995) Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Vet Parasitol* 60: 315-320.
- Larsen M, Nansen P, Grøndahl C, Thamsborg SM, Grønvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Monrad J (1996) The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology* 113: 1-6.
- Larsen ML, Ritz C, Petersen SL, Nielsen MK (2011) Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *Vet J* 188: 44-47.
- Lelis RT, Braga FR, de Carvalho LM, de Paula AT, Araujo JM, Fausto MC, Junior AM, Rodrigues JV, de Freitas Soares FE, Garcia JS, de Araújo JV (2014) Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Acta Trop* 139: 88-92.

- Lind EO, Kuzmina T, Ugglå A, Waller PJ, Höglund J (2007) A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Vet Res Commun* 31: 53-65.
- Lindgren K, Ljungvall O, Nilsson O, Ljungström BL, Lindahl C, Höglund J (2008) *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol* 151: 337-343.
- Liu K, Tian J, Xiang M, Liu X (2012) How carnivorous fungi use three-celled constricting rings to trap nematodes. *Protein Cell* 3: 325-328.
- Llerandi-Juárez RD, Mendoza de Gives P (1998) Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep. *J Helminthol* 72: 209-213.
- Lloyd S (2009) Effects of previous control programmes on the proportion of horses shedding small numbers of strongyle-type eggs. *Vet Rec* 164: 108-11.
- López-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson HB, Salinas J, Martín-Nieto J (2010) Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet Biol* 47: 342-351.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2006a) Field studies on endoparasites of Thoroughbred foals on seven farms in central Kentucky in 2004. *Parasitol Res* 98: 496-500.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS. (2006b). Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. *Parasitol Res* 99: 114-118.
- Lyons ET, Tolliver SC, Rathgeber RA, Collins SS (2007) Parasite field study in central Kentucky on thoroughbred foals (born in 2004) treated with pyrantel tartrate daily and other parasitocides periodically. *Parasitol Res* 100: 473-478.
- Lyons ET, Tolliver SC, Ionita M, Lewellen A, Collins SS (2008) Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 103: 209-215.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2009) Probable reason why small strongyle EPG counts are returning "early" after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 104: 569-574.
- Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo Pineda N, Lorenzo Hernández N (1982) Ovicidad fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 29: 265-270.
- Lýsek H, Krajčí D (1987) Penetration of oivicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. *Folia Parasitol* 34: 57-60.
- Lýsek H, Štěřba J (1991) Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol* 38: 255-259.

- Maciel AS, Freitas LG, Figueiredo LD, Campos AK, Mello IN (2012) Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. *Parasitology* 139: 1074-1085.
- Madeira de Carvalho LM (2006) Os equídeos em Portugal: de animais de produção a animais de companhia. Impacte nas Doenças Parasitárias. *Med Vet (revista da AEFMV)* 62: 13-24.
- Madeira de Carvalho LM, Gomes L, Cernea M, Cernea C, Santos CA, Bernardes N, Rosário MA, Soares MJ, Fazendeiro I (2007) Parasitismo gastrointestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. *Rev. Port. Ciencias Vet* 102: 225-231.
- Madeira de Carvalho LM, Cernea MS, Martins S, Sousa S, Gersão S, Cernea LC (2008) Comparative study of cyathostomin horse infection in Portugal and Romania based in L3 subpopulations of *Cyathostomum sensu latum*. *Sci Parasitol* 2: 48-56.
- Madeira de Carvalho LM, Bernardo FA, Paz-Silva A (2012) The role of fungi in the control of animal parasites – classification, mode of action and practical applications. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 271-308.
- Managadze D, Würtz C, Sichting M, Niehaus G, Veenhuis M, Rottensteiner H (2007) The peroxin PEX14 of *Neurospora crassa* is essential for the biogenesis of both glyoxysomes and Woronin bodies. *Traffic (Copenhagen, Dinamarca)* 8: 687–701.
- Martin-Downum K, Yazwinski T, Tucker C, Fincher M, Ralph J, Hamilton J (2001) Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. *Vet Parasitol* 101: 75-79.
- Meana A, Pato NF, Martín R, Mateos A, Pérez-García J, Luzón M (2005) Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Vet Parasitol* 130: 233-240.
- Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva-González I (2016) Frequency of invasive fungal infections in a Mexican High-Specialty Hospital. Experience of 21 years. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54: 581-587.
- Mendoza de Gives P, Zapata Nieto C, Hernández EL, Arellano ME, Rodríguez DH, Garduño RG (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Ann NY Acad Sci* 1081: 355-359.
- Mendoza de Gives P, Torres-Acosta JFJ (2012) Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types,*

- Environmental Impact and Role in Disease. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 389-408.
- Mercier P, Chick B, Alves-Branco F, White CR (2001) Comparative efficacy, persistent effect, and treatment intervals of antihelmintic pastes in naturally infected horses. *Vet Parasitol* 99: 29-39.
- Mfitilodze MW, Hutchinson GW (1987) Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 23: 121-133.
- Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC (2008) Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec* 162: 384-385.
- Monoson HL, Galsky AG, Stephano RS (1974) Studies on the ability of various nematodes to induce trap formation in a nematode-trapping fungus *Monacrosporium doedycoides*. *Nematologica* 20: 96-102.
- Morgan ER, Hetzel N, Povah C, Coles GC (2005) Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. *Vet Rec* 156: 597-600.
- Näreaho A, Vainio K, Oksanen A (2011) Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Vet Parasitol* 182: 372-377.
- Nielsen MK, Kaplan RM, Thamsborg SM, Monrad J, Olsen SN (2007) Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *Vet J* 174: 23-32.
- Nielsen MK, Fritzen B, Duncan JL, Guillot J, Eysker M, Dorchies P, Laugier C, Beugnet F, Meana A, Lussot-Kervern I, von Samson-Himmelstjerna G (2010) Practical aspects of equine parasite control: a review based upon a workshop discussion consensus. *Equine Vet J* 42: 460-468.
- Nielsen MK, Mittel L, Grice A, Erskine M, Graves E, Vaala W, Tully RC, French DD, Bowman R, Kaplan RM (2013) AAEP Parasite Control Guidelines. <http://www.aaep.org/custdocs/ParasiteControlGuidelinesFinal.pdf>
- Nielsen MK, Reinemeyer CR, Donecker JM, Leathwick DM, Marchiondo AA, Kaplan RM (2014a) Anthelmintic resistance in equine parasites--current evidence and knowledge gaps. *Vet Parasitol* 204: 55-63.
- Nielsen MK, Wang J, Davis R, Bellaw JL, Lyons ET, Lear TL, Goday C (2014b) *Parascaris univalens* -a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res* 113: 4485-4490.
- Nordbring-Hertz B (1977) Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica* 23: 443-451.

- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Ayala-Burgos A, Cob-Galera LA, Sandoval-Castro CA, Barrientos-Medina RC, Mendoza de Gives P (2008) Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Vet Parasitol* 158: 329-335.
- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P (2009) Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Vet Res* 5: 46.
- Osterman Lind EO, Rautalinko E, Ugglä A, Walle, PJ, Morrison DA, Höglund J (2007) Parasite control practices on Swedish horse farms. *J Acta Vet Scand* 49: 25.
- Palomero Salinero AM (2015) Análisis de la eficacia de hongos frente a parásitos que afectan a la gallina ponedora. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, Díez-Baños P (2005) Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res* 95: 129-135.
- Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss RO, Cortiñas FJ, Sánchez JA, Francisco R, Arias M, Suárez JL, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2011) Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet Parasitol* 179: 277-282.
- Paz-Silva A, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Oliver A, Suárez J, Francisco I, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Alimentación con concentrado fabricado con esporas de hongos para prevenir nematodosis intestinales. XVI Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 20-21 noviembre.
- Paz-Silva A, Bonilla R, Hernández JÁ, Arroyo F, Cazapal-Monteiro C, Romasanta Á, Francisco I, Arias MS, Sánchez-Andrade R (2016) Spreading of *Mucor circinelloides* spores can aid to prevent *Trichuris* sp. infection in captive dromedaries (*Camelus dromedarius*). 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku (Finland), 20-24 July.
- Peregrine A, McEwen B, Bienzle D, Kock T, Weese J (2006) Larval cyathostominosis in horses in Ontario: An emerging disease. *Can Vet J* 47: 80-82.
- Pereira JR, Vianna SS (2006) Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 140: 289-295.
- Pramer D, Stoll NR (1959) Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* 129: 966-967.

- Prasad P, Varshney D, Adholeya A (2015) Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. BMC Genomics 16: 1004.
- Quigley A, Sekiya M, Egan S, Wolfe A, Negredo C, Mulcahy G (2016) Prevalence of liver fluke infection in Irish horses and assessment of a serological test for diagnosis of equine fasciolosis. Equine Vet J. doi: 10.1111/evj.12577.
- Rahoo AM, Mukhtar T, Gowen SR, Pembroke B (2011) Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* larvae. Pak J Zool 43: 543-548.
- Rangaswami G, Bagyaraj DJ (2001) Agricultural Microbiology. 2nd Edition. Prentice Hall of India, New Delhi, 423 pp.
- Rehbein S, Visser M, Winter R (2013) Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. Parasitol Res 112: 407-413.
- Reinemeyer CR (1986) Small strongyles. Recent advances. Vet Clin N Am-Equine 2:281-312
- Reinemeyer CR (2009) Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. Parasit Vectors. Suppl 2: S8.
- Relf VE, Morgan ER, Hodgkinson JE, Matthews JB (2013) Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. Parasitology 140: 641-652.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A (2008) Resistencia antihelmíntica. Monografía Equinus 23: 88-101.
- Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A (2003) Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. Immunol Invest 32: 131-142.
- Rossano MG, Smith AR, Lyons ET (2010) Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. Vet Parasitol 173: 349-352.
- Rubner A (1996) Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. Stud Mycol 39: 1-134.
- Sagüés MF, Fusé LA, Fernández AS, Iglesias LE, Moreno FC, Saumell CA (2011) Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. Parasitol Res 109: 707-713.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C (2011) Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. Rev Iber Micol 28: 143-147.

- Sánchez Gómez JA (2012) Nuevas perspectivas para el control del parasitismo gastrointestinal de caballos en silvopastoreo. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Sánchez-Andrade R, Cortiñas FJ, Francisco I, Sánchez JA, Mula P, Cazapal C, Vázquez L, Suárez JL, Francisco R, Arias MS, Díez-Baños P, Scala A, Paz-Silva A (2010) A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Vet Parasitol* 171: 314-320.
- Sanchís J, Suárez J, Hillyer GV, Hernández JA, Solari MA, Cazapal-Monteiro C, Duque de Araújo AM, Madeira de Carvalho LM, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Determination of exposure to *Fasciola hepatica* in horses from Uruguay using a recombinant-based ELISA. *Vet Med-Czech* 60: 1-6.
- Sanchís Polto J, Madeira de Carvalho LM, Bonilla R, Duque de Araújo AM, Arroyo F, Suárez J, Solari MA, Romero JA, Sánchez-Andrade R (2014) Horse handling conditions and emergence of neglected infections: fasciolosis. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade Fernández R (eds.). *Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 127-144.
- Sandin A, Skidell J, Häggström J, Nilsson G (2000) Postmortem findings of gastric ulcers in Swedish horses older than age one year: a retrospective study of 3715 horses (1924-1996). *Equine Vet J* 32: 36-42.
- Santos CP, Padilha T, de Azevedo Rodrigues ML (2001) Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência Rural, Santa Maria* 31: 839-842.
- Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagües MF, Rodríguez E (2016) Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *J Helminthol* 90: 706-711.
- Schneider S, Pfister K, Becher AM, Scheuerle MC (2014) Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses - a risk assessment. *BMC Vet Res* 10: 262.
- Scholler M, Hagedorn G, Rubner A (1999) A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia* 51: 89-113.
- Scholler M, Rubner A (1994) Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol Res* 149: 145-149.
- Schougaard H, Nielsen MK (2007) Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec* 160: 439-440.

- Sengupta ME, Thapa S, Thamsborg SM, Mejer H (2016) Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Vet Parasitol* 217: 21-24.
- Seyoum Z, Tesfaye M, Derso S (2015) Prevalence, intensity and risk factors of infestation with major gastrointestinal nematodes in equines in and around Shashemane, Southern Ethiopia. *Trop An Health Prod* 47: 1515-1521.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Filho JDR (2010a) Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *J Equine Vet Sci* 30: 701-704.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CD, Frassy LN (2010b) In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Vet Parasitol* 172: 76-79.
- Singer JW, Bamka WJ, Kluchinski D, Govindasamy R (2002) Using the recommended stocking density to predict equine pasture management. *J Eq Vet Sci* 22:73-76.
- Slivinska K (2006) The gastro-intestinal parasites community of the Przewalski's horse, *Equus przewalskii* Poljakov, 1881, and the domestic horse in the Chernobyl exclusion zone. *Wiad Parazytol* 52: 55-58.
- Slocombe JO (2006) A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. *Vet Parasitol* 136: 127-135.
- Slocombe JO, De Gannes RV, Lake MC (2007) Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet Parasitol* 145: 371-376.
- Smith BP (2014) Large animal internal medicine. 5th edition. Elsevier Mosby, MI (USA).
- Sokoł R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Jasińska A, Ziółkowski H, Jaroszewski J (2015) A comparison of the efficacy and pharmacokinetics of ivermectin after spring and autumn treatments against Cyathostominae in horses. *Pol J Vet Sci* 18: 371-377.
- Sokoł R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Raś A, Rapacz-Leonard A, Koziątek S (2015) Estimation of infection of internal parasites in horses from different type of farms. *Ann Parasitol* 61: 189-192.
- Soulsby EJJ (1987) Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Interamericana. México DC, México.
- Soykan E, Oge H (2012) The prevalence of liver trematodes in equines in different cities of Turkey. *Turkiye Parazitol Derg* 36: 152-155.

- Steinbach T, Bauer C, Sasse H, Baumgärtner W, Rey-Moreno C, Hermosilla C, Damriyasa IM, Zahner H (2006) Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Vet Parasitol* 139: 115-131.
- Stirling GR (1991) Biological control of plant parasitic nematodes: Problems, progress and prospects. CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- Suárez J, Hernández JA, Oliver A, Torres MI, Sanchís J, Riádigos S, Palomero A, López T, Francisco I, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2016) Avances en el diagnóstico de la dicroceliosis equina. XVII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 18-19 noviembre.
- Tavel Ade O, Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, Ferreira SR, Carvalho GR (2011) Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 175: 92-96.
- Tavel Ade O, de Araújo JV, Braga FR, da Silveira WF, Dornelas e Silva VH, Carretta Júnior M, Borges LA, Araujo JM, Benjamin Ldos A, Carvalho GR, de Paula AT (2013) Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Res Vet Sci* 94: 568-572.
- Teixeira WF, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Fávero FC, Gomes LV, Buzzulini C, Prando L, Bichuette MA, Lopes WD, Oliveira GP, Costa AJ (2014) Endoparasites of horses from the Formiga city, located in center-west region of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23: 534-538.
- Terrill TH, Larsen M, Samples O, Husted S, Miller JE, Kaplan RM, Gelaye S (2004) Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet Parasitol* 120: 285-296.
- Uhlinger CA (2007) Evidence-based parasitology in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 23: 509-517.
- Valdéz-Cruz MP, Hernández-Gil M, Galindo-Rodríguez L, Alonso-Díaz MA (2013) Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Trop Anim Health Prod.* 45: 603-607.
- Van Wyk JA (2001). Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 55-67.

- Veronesi F, Moretta I, Moretti A, Fioretti DP, Genchi C (2009) Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet Parasitol* 161: 138-141.
- von Samson-Himmelstjerna G (2012) Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol* 185: 2-8.
- von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann S, Rohn K, Schnieder T, Epe C (2007) Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 144: 74-80.
- von Samson-Himmelstjerna G, Traversa D, Demeler J, Rohn K, Milillo P, Schurmann S, Lia R, Perrucci S, Di Regalbono AF, Beraldo P, Barnes H, Cobb R, Boeckh A (2009) Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2: S3.
- Waller PJ, Larsen M, Faedo M, Hennessy DR (1994) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 51: 289-299.
- Waller PJ, Ljungström BL, Schwan O, Martin LR, Morrison DA, Rydzik A (2006) Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Vet Scand* 47: 23-32.
- Wolstrup J, Nansen P, Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M (1996) Toward practical biological control of parasitic nematodes in domestic animals. *J Nematol* 28: 129-132.
- Yu Z-F, Mo M-H, Zhang Y, Zhang K-Q (2014) Taxonomy of nematode-trapping fungi from *Orbiliaceae*, *Ascomycota*. En: Zhang K-Q, Hyde KD (eds.). *Nematode-trapping fungi*. Dordrecht: Springer, pp. 41–209.
- Zareen,A, Siddiqui IA, Aleem FZ, Aki MJ, Shaukat SS (2001) Observations on the nematicidal effect of *Fusarium solani* on the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica*. *J Plant Pathol* 83: 207-214.
- Zarrin M, Rahdar M, Gholamian A (2015) Biological control of the nematode infective larvae of Trichostrongylidae family with filamentous fungi. *Jundishapur J Microbiol* 8: e17614.
- Anan'ko GG, Teplyakova TV (2011) Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. *Microbiology* 80: 188-193.

- Andersen UV, Howe DK, Olsen SN, Nielsen MK (2013) Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Vet Parasitol* 192: 1-9.
- Araújo JV (1998) Predacious activity of *Arthrobotrys* spp. isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1: 9-11.
- Araújo JV, Guimarães MP, Campos AK, Sá NC, Sarti P, Assis RCL (2004) Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural, Santa Maria-RS*. 34: 457-463.
- Araujo JM, de Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Ferreira SR (2009) Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Vet Parasitol* 166: 86-89.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO (2010) In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitol Res* 107: 103-108.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Tavela Ade O, Ferreira SR, Soares FE, Carvalho GR (2012) Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Braz J Vet Parasitol* 21: 157-160.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec* 168: 408.
- Arias MS, Piñeiro P, Hillyer GV, Francisco I, Cazapal-Monteiro CF, Suárez JL, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012a) Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. *Parasitol Res* 110: 1001-1007.
- Arias M, Suárez J, Cortiñas FJ, Francisco I, Suárez JL, Romasanta A, Cazapal-Monteiro C, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012b) Restoration of fungal biota in the soil is essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 341-358.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro C, Valderrábano E, Miguélez S, Rois JL, López-Arellano ME, Madeira de Carvalho L, Mendoza de Gives P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012) A Preliminary Study of the Biological Control of Strongyles Affecting Equids in a Zoological Park. *J Eq Vet Sci* 33: 1115-1120.

- Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Suárez J, Miguélez S, Francisco I, Arroyo FL, Suárez JL, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2013) Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int* 567876. doi: 10.1155/2013/567876.
- Arias MS, Sanchís J, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Miguélez S, Ortega E, Bonilla R, Miquel Femenias S, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2014) Exposición a parásitos hepáticos en caballos en pastoreo. XV Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 5-6 diciembre.
- Arias MS, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Suárez J, Francisco I, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A (2015) Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. *J Sci Technol Environ* 5: 1-16.
- Arroyo FL, Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Suárez J, Miguélez S, Romasanta A, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2016) The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biol Control* 92: 38-44.
- Arroyo FL, Hernández JÁ, Cazapal-Monteiro CF, Pedreira J, Sanchís J, Romasanta Á, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MA (2017) Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *J Parasitol*. doi: 10.1645/16-76.
- Badii MH, Abreu JL (2006) Control biológico una forma sustentable de control de plagas. (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.
- Bairden K, Davies HS, Gibson NR, Hood AJ, Parker LD (2006) Efficacy of moxidectin 2 per cent oral gel against cyathostomins, particularly third-stage inhibited larvae, in horses. *Vet Rec* 158: 766-767.
- Balan J, Lechevalier HA (1972) The predaceous fungus *Arthrobotrys dactyloides*: induction of trap formation. *Mycologia* 64: 919-922.
- Barron GL (1977) *The Nematode-destroying Fungi*. Canadian Biological Publications Ltd, Guelph, Ontario, Canada 140 pp.
- Baudena MA, Chapman MR, Larsen M, Klei TR (2000) Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet Parasitol* 89: 219-230.

- Bird J, Herd RP (1995) In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Vet Parasitol* 56: 181-187.
- Blaszkowska J, Kurnatowski P, Wojcik A, Goralska K, Szwabe K (2014) In vitro evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol* 199: 165-171.
- Boguś MI, Czygier M, Kddra E, Samborski J (2005) In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Exp Parasitol* 109: 115-123.
- Bohórquez A, Meana A, Pato NF, Luzón M (2014) Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. *Vet Parasitol* 204: 396-401.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 356-358.
- Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Campos AK (2009a) In vitro evaluation of nematode predacious fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomes infective larvae of equines (Nematoda: Cyathostominae). *Rev Bras Parasitol Vet Suppl* 1: 83-85.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Tavela AO, Campos AK, Carvalho GR (2009b) Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 163: 335-340.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Campos AK, Tavela AO, Ferreira SR, Frassy LN, Alves CD (2010) *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *J Helminthol* 84: 21-25.
- Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JV, Pinto OS (2011) Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *J Helminthol* 85: 7-11.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Tavela AO, Araújo JM, Carvalho RO, Fernandes FM, Queiroz JH (2012) Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. *Biocontrol Sci Technol* 22: 685-696.

- Brunori A, Buischio A, Cassinis A (1985) Introduzione allo studio dei funghi. Casa Editrice "Il Libro" – Italia, 222 pp.
- Burk SV (2013) Detection of antibodies against *Parascaris equorum* excretory-secretory antigens. *Theses and Dissertations – Animal and Food Sciences*. Paper 21. http://uknowledge.uky.edu/animalsci_std/21
- Buzatti A, De Paula Santos C, Fernandes MA, Yoshitani UY, Sprenger LK, Dos Santos CD, Molento MB (2015) *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp Parasitol* 159: 1-4.
- Canever RJ, Braga PR, Boeckh A, Grycajuck M, Bier D, Molento MB (2013) Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet Parasitol* 194, 35-39.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Alves CD (2010) Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol* 169: 123-127.
- Casillas-Aguilar JA, Mendoza de Gives P, López-Arellano ME, Hernández L, 2008. Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Animal biodiversity and emerging diseases*. *Ann NY Acad Sci* 1149: 161-163.
- Cate JR (1994) Integrated Pest Management: The Past of a Paradigm. National Audubon Society: 40 págs.
- Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Arias MS, Suárez JL, Miguélez S, Francisco I, Lago P, Rodríguez MI, Cortiñas FJ, Romasanta A (2014) Horse Rearing Conditions, Health Status and Risk of Sensitization to Gastrointestinal Parasites. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade Fernández R (eds.) *Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 73-92.
- Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Romasanta Á, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. *Parasitol Res* 114: 2443-2450.
- Cazapal-Monteiro CF (2016) Posibilidades de control de helmintozoonosis parasitarias en Galicia. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Chandler KJ, Love S (2002) Patterns of equine faecal egg counts following spring dosing with either fenbendazole or moxidectin. *Vet Rec* 151: 269-270.
- Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Hoglund J, Larsen M, Zahari WM (2002) Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small

- ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. Vet Res 33: 685-696.
- Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA (2002) Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. Vet Parasitol 103: 251-257.
- Ciarmela ML, Arambarri AM, Minvielle MC (2012) Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de *Toxocara canis*. Editorial: EAE Editorial Academia Espanola, United States.
- Cleale RM, Edmonds JD, Paul AJ, Reinemeyer CR, Chapman MR, Clem R, Meccoli RA, Tolliver SC, Amodie DM (2006) A multicenter evaluation of the effectiveness of Equest Gel (2% moxidectin) against parasites infecting equids. Vet Parasitol 137: 119-129.
- Coles GC (2002) Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. Vet Rec 151: 165-169.
- Coles G, Rhodes A (2005) Control of nematode infections in horses. Vet Rec 157: 123.
- Colvin AF, Walkden-Brown SW, Knox MR, Scott JM (2008) Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. Vet Parasitol 153: 108-120.
- Comer KC, Hillyer MH, Coles GC (2006) Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. Vet Rec 158: 596-598.
- Corning S (2009) Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. Parasit Vectors 2 Suppl 2: S1.
- Cortiñas FJ, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Suárez J, López de Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A, Arias MS (2015) Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. Biocontrol Sci Technol 25: 1443-1452.
- Cortiñas FJ (2016) Desarrollo de ganadería ecológica e inclusión social. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Cutolo AA, Santos AT, Allegretti SM (2011) Field study on the efficacy of an oral 2% ivermectin formulation in horses. Rev Bras Parasitol Vet 20: 171-175.
- Da Silva ME, de Araújo JV, Braga FR, Borges LA, Soares FE, Lima Wdos S, Guimarães MP (2013) Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. BMC Res Notes 6: 340.
- De Almeida GL, Santurio JM, Filho JO, Zanette RA, Camillo G, Flores AG, Da Silva JH, De La Rue ML (2012) Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. Parasitol Res 110: 657-662
- De Carvalho LM, Braga FR, Domingues RR, Araujo JM, Lelis RT, de Paula AT, da Silveira WF, de Araújo JV (2014) Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*

- and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. J Basic Microbiol 54 Suppl 1: S109-S114.
- De Mello IN, Braga FR, Monteiro TS, Freitas LG, Araujo JM, Soares FE, Araújo JV (2014) Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. Rev Iberoam Micol 31: 114-118.
- Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Puppim AC, Perboni WR (2013) *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. Parasitol Res 112: 2131-2136.
- Dobson RJ, Besier RB, Barnes EH, Love SCJ, Visard A, Bell LF, Le Jambre LF (2001) Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance. Austr Vet J 79: 756-761.
- Duddington CL (1951) Further records of predacious fungi. I. Transactions of the British Mycological Society 33: 209-214.
- Duque De Araújo Munhoz AM (2014) Principales parasitosis gástricas en équidos de Portugal. Tesis Doctoral. Faculdade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Ehizibolo DO, Kamani J, Ehizibolo PO, Egwu KO, Dogo GI, Salami-Shinaba JO (2012). Prevalence and significance of parasites of horses in some States of northern Nigeria. J Equine Sci 23: 1-4.
- Elsener J, Villeneuve A (2009) Comparative long-term efficacy of ivermectin and moxidectin over winter in Canadian horses treated at removal from pastures for winter housing. Can Vet J 50: 486-490.
- Epe C, Coati N, Schnieder T (2004) Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002. Dtsch Tierarztl Wochenschr 111: 243-247.
- Epe C, Holst C, Koopmann R, Schieder T, Larsen M, von Samson-Himmelstjerna G (2008) Investigation on the influence of nematophagous fungi as feed additive on nematode infection risk of sheep and goats on pasture. Agric Forest Res 3: 191-152.
- Esteves I, Peteira B, Atkins SD, Magan N, Kerry B (2009) Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. Mycol Res 113: 867-876.
- Fan CK, Su KE (2004). Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Int 53: 263-271.
- Feder WA (1960) Osmotic destruction of plant parasitic and saprophytic nematodes by the addition of sugars to the soil. PI Dis Reprtr 44: 883-885.

- Feder WA, Everard C, Wootton L (1963) Sensitivity of several species of the nematophagous fungus *Dactylella* to a morphogenic substance derived from free-living nematodes. *Nematologica* 9: 49-54.
- Federica SM, Alberto FL, Emilia IL, Carina MF, Alfredo SC (2013) Optimization of production of chlamydospores of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in solid culture media. *Parasitol Res* 112: 1047-1051.
- FEEDAP. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of the micro-organism preparation of *Duddingtonia flagrans*, for use as a feed additive for calves in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Question No EFSA-Q-2004-115). Adopted on 7 of March 2006. *The EFSA Journal* (2006) 334: 1-8.
- Fernández AS, Henningsen E, Larsen M, Nansen P, Grønvold J, Søndergaard J (1999) A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Vet J* 31: 488-491.
- Fernández AS, Larsen M, Wolstrup J, Grønvold J, Nansen P, Bjørn H (1999) Growth rate and trapping efficacy of nematode trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitol Res* 85: 661-668.
- Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, Frassy LN, Freitas LG (2010) Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Trop Anim Health Prod* 43: 639-642.
- Fikru R, Reta D, Teshale S, Bizunesh M (2005) Prevalence of equine gastrointestinal parasites in western highlands of Oromia, Ethiopia. *Bull An Health Prod Afr* 53: 161-166.
- Flament Simon S (2015) Prevención de zoonosis parasitarias mediante hongos telúricos. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez I (2010) Epidemiología de los principales parasitismos del caballo en Galicia. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez R (2013) Utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de infecciones parasitarias en équidos. Tesis Doctoral, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco I, Arias M, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Sánchez JA, Uriarte J, Suárez JL, Morroondo P, Sánchez-Andrade R, Díez-Baños P, Paz-Silva A (2009a) Silvopastoralism and autochthonous equine livestock: analysis of the infection by endoparasites. *Vet Parasitol* 164: 357-362.

- Francisco I, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Arias M, Mula P, Suárez JL, Morrondo P, Díez-Baños P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2009b) Clinical trial of efficacy of ivermectin pour-on against gastrointestinal parasitic nematodes in silvopasturing horses. *Equine Vet J* 41: 713-715.
- Francisco I, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Suárez J, Cazapal C, Suárez JL, Arias MS, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Efficacy of ivermectin pour-on against nematodes infecting foals on pasture: coprological and biochemical analysis. *J Equine Vet Sci* 31: 530-535.
- Francisco R, Paz-Silva A, Francisco I, Cortiñas FJ, Miguélez S, Suárez J, Sánchez-Andrade R (2012) Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. *J Eq Vet Sci* 32: 274-280.
- Fritzen B, Rohn K, Schnieder T, Von Samson-Himmelstjerna G (2010) Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Vet J* 42: 79-83.
- Getachew M, Trawford A, Feseha G, Reid SWJ (2010) Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 42: 27-33.
- Geurden T, Van Doorn D, Claerebout E, Kooyman F, De Keersmaecker S, Vercruysse J, Besognet B, Vanimisetti B, Di Regalbono AF, Beraldo P, Di Cesare A, Traversa D (2014) Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Vet Parasitol* 204: 291-296.
- Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA (2008) Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malays J Microbiol* 4: 35-41.
- Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, Rawat H, Friberg L (1996) Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J Helminthol* 70: 291-297.
- Gürler AT, Bölükbaş CS, Açıci M, Umur S (2010) Check list of the helminths of equines in Turkey. *Türkiye Parazitol Derg* 34: 40-44.
- Gutiérrez-Delgado EM, Treviño-González JL, Montemayor-Alatorre A, Ceceñas-Falcón LA, Ruiz-Holguín E, Andrade-Vázquez CJ, Lara-Medrano R, Ramos-Jiménez J (2016) Chronic rhino-orbito-cerebral mucormycosis: A case report and review of the literature. *Ann Med Surg (Lond)* 6: 87-91.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.

- Hernández Malagón JÁ (2014). Posibilidades de control de helmintozoonosis por ascáridos mediante el uso de hongos telúricos. Memoria de Licenciatura, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Hernández JÁ, Arroyo FL, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Romasanta Á, López-Arellano ME, Pedreira J, de Carvalho LM, Sánchez-Andrade R, Arias MS, de Gives PM, Paz-Silva A (2016) Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* 229: 37-44.
- Hertzberg H, Schwarzwald CC, Grimm F, Frey CF, Gottstein B, Gerber V (2014) Helminth control in the adult horse: the need for a re-orientation. *Schweiz Arch Tierheilkd* 156: 61-70.
- Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, Miethe N, Zessin KH, Clausen PH (2011) Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 108: 1083-1091.
- Johns H, Johnson K, Turner L (2004) Rotational grazing. University of Kentucky Coop. Ext. Serv. ID-143, Lexington.
- Hodgkinson JE, Clark HJ, Kaplan RM, Lake SL, Matthews JB (2008) The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int J Parasitol* 38: 1149-1160.
- Irving F, Kerry BR (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica* 32: 474-485.
- Jackson F, Coop RL (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: S95-S107.
- Jatala P (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 453-489.
- Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481.
- Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruysse J, Jackson F (2009) The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 164: 3-11.
- Kenyon F, Jackson F (2012) Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet Parasitol* 186: 10-17.
- Kerry BR (1987). Biological control. En: Principles and practice of nematode control in crops. Academia Press Australia, Chapter 7, pp. 233-263.

- Khan MR, Zaidi B, Haque Z (2012) Nematicides control rice root-knot, caused by *Meloidogyne graminicola*. *Phytopathol Mediterr* 51: 298-306.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS (2008) Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 753-763.
- Kumar N, Rao TKS, Varghese A, Rathor VS (2013) Internal parasite management in grazing livestock. *J Parasit Dis* 37: 151-157.
- Kuzmina TA, Kuzmin YI, Kharchenko VA (2006) Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Vet Parasitol* 141: 264-272.
- Kuzmina TA, Kharchenko VO (2008) Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Vet Parasitol* 154: 277-288.
- Kwa MS, Veenstra JG, Van Dijk M, Roos MH (1995) Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246: 500-510.
- Larriba E, Martín-Nieto J, López-Llorca LV (2012) Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. *Can J Microbiol* 58: 815-827.
- Larsen M, Nansen P, Henriksen SA, Wolstrup J, Grønvold J, Zorn A, Wedø E (1995) Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Vet Parasitol* 60: 315-320.
- Larsen M, Nansen P, Grøndahl C, Thamsborg SM, Grønvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Monrad J (1996) The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology* 113: 1-6.
- Larsen ML, Ritz C, Petersen SL, Nielsen MK (2011) Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. *Vet J* 188: 44-47.
- Lelis RT, Braga FR, de Carvalho LM, de Paula AT, Araujo JM, Fausto MC, Junior AM, Rodrigues JV, de Freitas Soares FE, Garcia JS, de Araújo JV (2014) Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Acta Trop* 139: 88-92.
- Lind EO, Kuzmina T, Ugglä A, Waller PJ, Höglund J (2007) A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Vet Res Commun* 31: 53-65.

- Lindgren K, Ljungvall O, Nilsson O, Ljungström BL, Lindahl C, Höglund J (2008) *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol* 151: 337-343.
- Liu K, Tian J, Xiang M, Liu X (2012) How carnivorous fungi use three-celled constricting rings to trap nematodes. *Protein Cell* 3: 325-328.
- Llerandi-Juárez RD, Mendoza de Gives P (1998) Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep. *J Helminthol* 72: 209-213.
- Lloyd S (2009) Effects of previous control programmes on the proportion of horses shedding small numbers of strongyle-type eggs. *Vet Rec* 164: 108-11.
- López-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson HB, Salinas J, Martín-Nieto J (2010) Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet Biol* 47: 342-351.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2006a) Field studies on endoparasites of Thoroughbred foals on seven farms in central Kentucky in 2004. *Parasitol Res* 98: 496-500.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS. (2006b). Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. *Parasitol Res* 99: 114-118.
- Lyons ET, Tolliver SC, Rathgeber RA, Collins SS (2007) Parasite field study in central Kentucky on thoroughbred foals (born in 2004) treated with pyrantel tartrate daily and other parasiticides periodically. *Parasitol Res* 100: 473-478.
- Lyons ET, Tolliver SC, Ionita M, Lewellen A, Collins SS (2008) Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 103: 209-215.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2009) Probable reason why small strongyle EPG counts are returning "early" after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 104: 569-574.
- Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo Pineda N, Lorenzo Hernández N (1982) Ovicidad fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 29: 265-270.
- Lýsek H, Krajčí D (1987) Penetration of oivicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. *Folia Parasitol* 34: 57-60.
- Lýsek H, Štěrbá J (1991) Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol* 38: 255-259.
- Maciel AS, Freitas LG, Figueiredo LD, Campos AK, Mello IN (2012) Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. *Parasitology* 139: 1074-1085.

- Madeira de Carvalho LM (2006) Os equídeos em Portugal: de animais de produção a animais de companhia. Impacte nas Doenças Parasitárias. Med Vet (revista da AEFMV) 62: 13-24.
- Madeira de Carvalho LM, Gomes L, Cernea M, Cernea C, Santos CA, Bernardes N, Rosário MA, Soares MJ, Fazendeiro I (2007) Parasitismo gastrointestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabilados. Rev. Port. Ciencias Vet 102: 225-231.
- Madeira de Carvalho LM, Cernea MS, Martins S, Sousa S, Gersão S, Cernea LC (2008) Comparative study of cyathostomin horse infection in Portugal and Romania based in L3 subpopulations of *Cyathostomum sensu latum*. Sci Parasitol 2: 48-56.
- Madeira de Carvalho LM, Bernardo FA, Paz-Silva A (2012) The role of fungi in the control of animal parasites – classification, mode of action and practical applications. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 271-308.
- Managadze D, Würtz C, Sichtung M, Niehaus G, Veenhuis M, Rottensteiner H (2007) The peroxin PEX14 of *Neurospora crassa* is essential for the biogenesis of both glyoxysomes and Woronin bodies. Traffic (Copenhagen, Dinamarca) 8: 687–701.
- Martin-Downum K, Yazwinski T, Tucker C, Fincher M, Ralph J, Hamilton J (2001) Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole. Vet Parasitol 101: 75-79.
- Meana A, Pato NF, Martín R, Mateos A, Pérez-García J, Luzón M (2005) Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. Vet Parasitol 130: 233-240.
- Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva-González I (2016) Frequency of invasive fungal infections in a Mexican High-Specialty Hospital. Experience of 21 years. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 54: 581-587.
- Mendoza de Gives P, Zapata Nieto C, Hernández EL, Arellano ME, Rodríguez DH, Garduño RG (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. Ann NY Acad Sci 1081: 355-359.
- Mendoza de Gives P, Torres-Acosta JFJ (2012) Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 389-408.

- Mercier P, Chick B, Alves-Branco F, White CR (2001) Comparative efficacy, persistent effect, and treatment intervals of antihelmintic pastes in naturally infected horses. *Vet Parasitol* 99: 29-39.
- Mfitilodze MW, Hutchinson GW (1987) Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 23: 121-133.
- Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC (2008) Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec* 162: 384-385.
- Monoson HL, Galsky AG, Stephano RS (1974) Studies on the ability of various nematodes to induce trap formation in a nematode-trapping fungus *Monacrosporium doedycoides*. *Nematologica* 20: 96-102.
- Morgan ER, Hetzel N, Povah C, Coles GC (2005) Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. *Vet Rec* 156: 597-600.
- Näreaho A, Vainio K, Oksanen A (2011) Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Vet Parasitol* 182: 372-377.
- Nielsen MK, Kaplan RM, Thamsborg SM, Monrad J, Olsen SN (2007) Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *Vet J* 174: 23-32.
- Nielsen MK, Fritzen B, Duncan JL, Guillot J, Eysker M, Dorchies P, Laugier C, Beugnet F, Meana A, Lussot-Kervern I, von Samson-Himmelstjerna G (2010) Practical aspects of equine parasite control: a review based upon a workshop discussion consensus. *Equine Vet J* 42: 460-468.
- Nielsen MK, Mittel L, Grice A, Erskine M, Graves E, Vaala W, Tully RC, French DD, Bowman R, Kaplan RM (2013) AAEP Parasite Control Guidelines. <http://www.aaep.org/custdocs/ParasiteControlGuidelinesFinal.pdf>
- Nielsen MK, Reinemeyer CR, Donecker JM, Leathwick DM, Marchiondo AA, Kaplan RM (2014a) Anthelmintic resistance in equine parasites--current evidence and knowledge gaps. *Vet Parasitol* 204: 55-63.
- Nielsen MK, Wang J, Davis R, Bellaw JL, Lyons ET, Lear TL, Goday C (2014b) *Parascaris univalens*-a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res* 113: 4485-4490.
- Nordbring-Hertz B (1977) Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica* 23: 443-451.
- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Ayala-Burgos A, Cob-Galera LA, Sandoval-Castro CA, Barrientos-Medina RC, Mendoza de Gives P (2008) Assessing the

- efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Vet Parasitol* 158: 329-335.
- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P (2009) Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Vet Res* 5: 46.
- Osterman Lind EO, Rautalinko E, Ugglä A, Walle, PJ, Morrison DA, Höglund J (2007) Parasite control practices on Swedish horse farms. *J Acta Vet Scand* 49: 25.
- Palomero Salinero AM (2015) Análisis de la eficacia de hongos frente a parásitos que afectan a la gallina ponedora. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, Díez-Baños P (2005) Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res* 95: 129-135.
- Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss RO, Cortiñas FJ, Sánchez JA, Francisco R, Arias M, Suárez JL, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2011) Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology* 179: 277-282.
- Paz-Silva A, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Oliver A, Suárez J, Francisco I, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Alimentación con concentrado fabricado con esporas de hongos para prevenir nematodosis intestinales. XVI Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 20-21 noviembre.
- Paz-Silva A, Bonilla R, Hernández JÁ, Arroyo F, Cazapal-Monteiro C, Romasanta Á, Francisco I, Arias MS, Sánchez-Andrade R (2016) Spreading of *Mucor circinelloides* spores can aid to prevent *Trichuris* sp. infection in captive dromedaries (*Camelus dromedarius*). 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku (Finland), 20-24 July.
- Peregrine A, McEwen B, Bienzle D, Kock T, Weese J (2006) Larval cyathostominosis in horses in Ontario: An emerging disease. *Can Vet J* 47: 80-82.
- Pereira JR, Vianna SS (2006) Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 140: 289-295.
- Pramer D, Stoll NR (1959) Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* 129: 966-967.
- Prasad P, Varshney D, Adholeya A (2015) Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. *BMC Genomics* 16: 1004.

- Quigley A, Sekiya M, Egan S, Wolfe A, Negredo C, Mulcahy G (2016) Prevalence of liver fluke infection in Irish horses and assessment of a serological test for diagnosis of equine fasciolosis. *Equine Vet J*. doi: 10.1111/evj.12577.
- Rahoo AM, Mukhtar T, Gowen SR, Pembroke B (2011) Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* larvae. *Pak J Zool* 43: 543-548.
- Rangaswami G, Bagyaraj DJ (2001) *Agricultural Microbiology*. 2nd Edition. Prentice Hall of India, New Delhi, 423 pp.
- Rehbein S, Visser M, Winter R (2013) Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol Res* 112: 407-413.
- Reinemeyer CR (1986) Small strongyles. Recent advances. *Vet Clin N Am-Equine* 2:281-312
- Reinemeyer CR (2009) Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasit Vectors*. Suppl 2: S8.
- Relf VE, Morgan ER, Hodgkinson JE, Matthews JB (2013) Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology* 140: 641-652.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A (2008) Resistencia antihelmíntica. *Monografía Equinus* 23: 88-101.
- Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A (2003) Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays--analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. *Immunol Invest* 32: 131-142.
- Rossano MG, Smith AR, Lyons ET (2010) Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Vet Parasitol* 173: 349-352.
- Rubner A (1996) Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Stud Mycol* 39: 1-134.
- Sagüés MF, Fusé LA, Fernández AS, Iglesias LE, Moreno FC, Saumell CA (2011) Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Res* 109: 707-713.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C (2011) Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. *Rev Iber Micol* 28: 143-147.
- Sánchez Gómez JA (2012) Nuevas perspectivas para el control del parasitismo gastrointestinal de caballos en silvopastoreo. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

- Sánchez-Andrade R, Cortiñas FJ, Francisco I, Sánchez JA, Mula P, Cazapal C, Vázquez L, Suárez JL, Francisco R, Arias MS, Díez-Baños P, Scala A, Paz-Silva A (2010) A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Vet Parasitol* 171: 314-320.
- Sanchís J, Suárez J, Hillyer GV, Hernández JA, Solari MA, Cazapal-Monteiro C, Duque de Araújo AM, Madeira de Carvalho LM, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Determination of exposure to *Fasciola hepatica* in horses from Uruguay using a recombinant-based ELISA. *Vet Med-Czech* 60: 1-6.
- Sanchís Polto J, Madeira de Carvalho LM, Bonilla R, Duque de Araújo AM, Arroyo F, Suárez J, Solari MA, Romero JA, Sánchez-Andrade R (2014) Horse handling conditions and emergence of neglected infections: fasciolosis. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade R (eds.). *Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 127-144.
- Sandin A, Skidell J, Häggström J, Nilsson G (2000) Postmortem findings of gastric ulcers in Swedish horses older than age one year: a retrospective study of 3715 horses (1924-1996). *Equine Vet J* 32: 36-42.
- Santos CP, Padilha T, de Azevedo Rodrigues ML (2001) Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência Rural, Santa Maria* 31: 839-842.
- Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagües MF, Rodríguez E (2016) Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *J Helminthol* 90: 706-711.
- Schneider S, Pfister K, Becher AM, Scheuerle MC (2014) Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses - a risk assessment. *BMC Vet Res* 10: 262.
- Scholler M, Hagedorn G, Rubner A (1999) A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia* 51: 89-113.
- Scholler M, Rubner A (1994) Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol Res* 149: 145-149.
- Schougaard H, Nielsen MK (2007) Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec* 160: 439-440.
- Sengupta ME, Thapa S, Thamsborg SM, Mejer H (2016) Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Vet Parasitol* 217: 21-24.

- Seyoum Z, Tesfaye M, Derso S (2015) Prevalence, intensity and risk factors of infestation with major gastrointestinal nematodes in equines in and around Shashemane, Southern Ethiopia. *Trop An Health Prod* 47: 1515-1521.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Filho JDR (2010a) Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *J Equine Vet Sci* 30: 701-704.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CD, Frassy LN (2010b) In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Vet Parasitol* 172: 76-79.
- Singer JW, Bamka WJ, Kluchinski D, Govindasamy R (2002) Using the recommended stocking density to predict equine pasture management. *J Eq Vet Sci* 22:73-76.
- Slivinska K (2006) The gastro-intestinal parasites community of the Przewalski's horse, *Equus przewalskii* Poljakov, 1881, and the domestic horse in the Chernobyl exclusion zone. *Wiad Parazytol* 52: 55-58.
- Slocombe JO (2006) A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. *Vet Parasitol* 136: 127-135.
- Slocombe JO, De Gannes RV, Lake MC (2007) Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet Parasitol* 145: 371-376.
- Smith BP (2014) Large animal internal medicine. 5th edition. Elsevier Mosby, MI (USA).
- Sokół R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Raś A, Rapacz-Leonard A, Koziątek S (2015) Estimation of infection of internal parasites in horses from different type of farms. *Ann Parasitol* 61: 189-192.
- Soulsby EJJ (1987) Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Interamericana. México DC, México.
- Soykan E, Oge H (2012) The prevalence of liver trematodes in equines in different cities of Turkey. *Turkiye Parazitol Derg* 36: 152-155.
- Steinbach T, Bauer C, Sasse H, Baumgärtner W, Rey-Moreno C, Hermosilla C, Damriyasa IM, Zahner H (2006) Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Vet Parasitol* 139: 115-131.
- Stirling GR (1991) Biological control of plant parasitic nematodes: Problems, progress and prospects. CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- Suárez J, Hernández JA, Oliver A, Torres MI, Sanchís J, Riádigos S, Palomero A, López T, Francisco I, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2016) Avances en el diagnóstico

- de la dicroceliosis equina. XVII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 18-19 noviembre.
- Tavela Ade O, Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, Ferreira SR, Carvalho GR (2011) Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 175: 92-96.
- Tavela Ade O, de Araújo JV, Braga FR, da Silveira WF, Dornelas e Silva VH, Carretta Júnior M, Borges LA, Araujo JM, Benjamin Ldos A, Carvalho GR, de Paula AT (2013) Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Res Vet Sci* 94: 568-572.
- Teixeira WF, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Fávero FC, Gomes LV, Buzzulini C, Prando L, Bichuette MA, Lopes WD, Oliveira GP, Costa AJ (2014) Endoparasites of horses from the Formiga city, located in center-west region of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23: 534-538.
- Terrill TH, Larsen M, Samples O, Husted S, Miller JE, Kaplan RM, Gelaye S (2004) Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet Parasitol* 120: 285-296.
- Uhlinger CA (2007) Evidence-based parasitology in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 23: 509-517.
- Valdéz-Cruz MP, Hernández-Gil M, Galindo-Rodríguez L, Alonso-Díaz MA (2013) Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Trop Anim Health Prod.* 45: 603-607.
- Van Wyk JA (2001). Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 55-67.
- Veronesi F, Moretta I, Moretti A, Fioretti DP, Genchi C (2009) Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet Parasitol* 161: 138-141.
- von Samson-Himmelstjerna G (2012) Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol* 185: 2-8.
- von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann S, Rohn K, Schnieder T, Epe C (2007) Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of

- Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 144: 74-80.
- von Samson-Himmelstjerna G, Traversa D, Demeler J, Rohn K, Milillo P, Schurmann S, Lia R, Perrucci S, Di Regalbono AF, Beraldo P, Barnes H, Cobb R, Boeckh A (2009) Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2: S3.
- Waller PJ, Larsen M, Faedo M, Hennessy DR (1994) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 51: 289-299.
- Waller PJ, Ljungström BL, Schwan O, Martin LR, Morrison DA, Rydzik A (2006) Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Vet Scand* 47: 23-32.
- Wolstrup J, Nansen P, Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M (1996) Toward practical biological control of parasitic nematodes in domestic animals. *J Nematol* 28: 129-132.
- Yu Z-F, Mo M-H, Zhang Y, Zhang K-Q (2014) Taxonomy of nematode-trapping fungi from *Orbiliaceae*, *Ascomycota*. En: Zhang K-Q, Hyde KD (eds.). *Nematode-trapping fungi*. Dordrecht: Springer, pp. 41–209.
- Zareen,A, Siddiqui IA, Aleem FZ, Aki MJ, Shaukat SS (2001) Observations on the nematicidal effect of *Fusarium solani* on the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica*. *J Plant Pathol* 83: 207-214.
- Zarrin M, Rahdar M, Gholamian A (2015) Biological control of the nematode infective larvae of Trichostrongylidae family with filamentous fungi. *Jundishapur J Microbiol* 8: e17614.